

TESIS DOCTORAL

Mutación y recombinación en cepas naturales de
Escherichia coli y
efecto de los antibióticos sobre la recombinación

Elena López Camacho

Centro Nacional de Biotecnología

Universidad Autónoma de Madrid



RESÚMEN EN INGLÉS.....	1
ABREVIATURAS	2
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN COMO MOTORES DE LA EVOLUCIÓN.....	4
1.1.1. Incidencia de mutadores en el laboratorio y en la naturaleza.....	5
1.1.2. Estrés antibiótico como modelo de estudio de la evolución adaptativa.....	7
1.2. HIPERMUTADORES E HIPERRECOMBINADORES	8
1.2.1. Hipermutación estable	8
1.2.1.1. MMR o sistema de reparación de emparejamientos erróneos	10
1.2.1.2. Sistema GO.....	12
1.2.1.3. Hipermutación estable como estrategia adaptativa	13
1.2.2 Hipermutación transitoria. El Sistema SOS.....	14
1.2.2.1. El sistema SOS.....	14
1.2.2.2. Mutagénesis SOS	16
1.2.2.3. Antibióticos inductores del Sistema SOS.....	17
1.3. MMR, SOS Y RECOMBINACIÓN.....	19
1.3.1. Control de la barrera genética entre especies bacterianas: MMR y sistema SOS.....	20
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. MEDIOS, REACTIVOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	24
3.2. CEPAS.	24
3.2.1. Cepas de laboratorio y plásmidos.....	24
3.2.2. Colecciones de cepas naturales.	26
3.2.2.1. Colección de cepas Comensales.....	27
3.2.2.2. Colección de cepas Patógenas.....	27
3.3. TÉCNICAS GENERALES DE GENÉTICA BACTERIANA.	27
3.4. TÉCNICAS DE DNA.....	28
3.4.1. Técnicas generales.	28
3.4.2. Secuenciación de DNA.....	28
3.4.3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	28
3.4.4. Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD).....	29
3.4.5. Análisis filogenético.....	30
3.5. ESTUDIO DE LA RECOMBINACIÓN	30
3.5.1. Construcción de las cepas lacZ diploides.	30
3.5.2. Estudio del efecto de los antibióticos en la recombinación intracromosómica.	31
3.5.3. Estudio del efecto de los antibióticos en la recombinación intercromosómica.....	32
3.5.3.1. Experimentos de Conjugación en <i>E.coli</i>	32
3.5.3.2. Experimentos de Conjugación en <i>P.aeruginosa</i>	33
3.5.4. Frecuencias de recombinación inter e intraespecíficas de las cepas comensales y patógenas de <i>E.coli</i>	33

3.6. DETERMINACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE MUTACIÓN.....	34
3.7. ESTUDIO DE LA TRANSCRIPCIÓN DE GENES DEL SISTEMA SOS.	35
3.7.1. Estudio de la transcripción de <i>recA</i> y <i>dinB</i> en las cepas de la colección de comensales de <i>E.coli</i>	35
3.8. TINCIÓN VITAL (LIVE/ DEAD) Y DAPI.	36
3.9. CÁLCULO DE LA CMI.	36
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	37
4. RESULTADOS.....	38
CAPÍTULO 1: ESTUDIO DE LA RECOMBINACIÓN EN CEPAS NATURALES DE <i>E.COLI</i>.....	38
4.1. TIPACIÓN MOLECULAR POR RAPD DE LAS CEPAS COMENSALES DE <i>E.COLI</i>	38
4.2. ESTUDIO DE LA FRECUENCIA DE MUTACIÓN EN CEPAS COMENSALES DE <i>E.COLI</i>	38
4.3. ESTUDIO DE LA FRECUENCIA DE RECOMBINACIÓN EN CEPAS COMENSALES DE <i>E.COLI</i>	39
4.3.1. Frecuencias de recombinación de las cepas comensales de <i>E.coli</i>	41
4.3.2. Análisis de las regiones diana.....	44
4.4. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES DEL SISTEMA SOS EN CEPAS COMENSALES DE <i>E.COLI</i>	46
4.5. RELACIÓN ENTRE MUTACIÓN, RECOMBINACIÓN Y TRANSCRIPCIÓN DE <i>RECA</i> Y <i>DINB</i> EN CEPAS COMENSALES DE <i>E.COLI</i>	49
4.6. ESTUDIO DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN EN CEPAS PATÓGENAS DE <i>E.COLI</i>	49
4.6.1. Frecuencias de mutación de las cepas patógenas de <i>E.coli</i>	50
4.6.2. Frecuencias de recombinación de las cepas patógenas de <i>E.coli</i>	51
4.7. DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE RECOMBINACIÓN EN CEPAS NATURALES DE <i>E.COLI</i>	52
4.8. DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE MUTACIÓN EN CEPAS NATURALES DE <i>E.COLI</i>	53
CAPÍTULO 2: ANTIBIÓTICOS Y RECOMBINACIÓN.....	55
4.1. INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SOS POR CIP Y CAZ.....	56
4.2. ANTIBIÓTICOS Y RECOMBINACIÓN EN <i>E.COLI</i>	57
4.2.1. Efecto de Cip y Caz sobre la recombinación intracromosómica de <i>E.coli</i>	57
4.2.1.1. Dependencia de la inducción del SOS para la estimulación de la recombinación mediada por Cip y por Caz.....	60
4.2.1.2. Caracterización molecular de las vías implicadas en la estimulación de la recombinación mediada por Cip.....	60
4.2.1.3. Efecto del sistema MMR en la estimulación de la recombinación mediada por Cip.....	61
4.2.1.4. Efecto del tratamiento con concentraciones subinhibidoras de antibiótico sobre la viabilidad de las bacterias.....	63
4.2.2. Efecto de otros antibióticos sobre la recombinación intracromosómica en <i>E.coli</i>	64
4.2.3. Efecto de Cip sobre la recombinación intercromosómica de <i>E.coli</i>	68
4.3. ANTIBIÓTICOS Y RECOMBINACIÓN EN <i>P.AERUGINOSA</i>	69
5. DISCUSIÓN.....	71
5.1. MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN EN LA NATURALEZA.....	71

5.1.1. Mutación	71
5.1.2. Recombinación.....	74
5.2. ANTIBIÓTICOS Y RECOMBINACIÓN	81
6. CONCLUSIONES	88
7. BIBLIOGRAFÍA	90

RESÚMEN EN INGLÉS

The importance of the hypermutant/hyperrecombinant states on bacterial evolution and adaptation has been demonstrated both in laboratory and natural environments. Hypermutation, as an adaptive strategy, is limited at medium/long term because the rate of deleterious mutations is higher than that of beneficial or neutral, thus this hypermutation may reduce the fitness. However, strains having high mutations rates are not rare in natural populations and defects in the mismatch repair system (MMR) are the most frequent cause of hypermutation in naturally-occurring strains. This repair system controls the fidelity of DNA replication by eliminating biosynthetic errors. In addition, the MMR system is involved in the maintenance of chromosomal structural integrity and in the control of horizontal gene transfer by preventing recombination between non-identical DNA sequences. Thus, the inactivation of the MMR causes not only a hypermutant phenotype, but a hyper-recombinant too. Many studies have been published on hypermutants in nature, yet none on hyper-recombination. Can both states, hypermutant and hyper-recombinant, occur independently? To answer this question we have studied the mutation and recombination frequencies of two collections of *E.coli* natural isolates (pathogenic and commensal strains). Recombination data show that the systems which prevent chromosomal gene transfer between bacterial species seems to be less restrictive in natural populations than in laboratory strains. On the other hand we have found that many natural strains have a hyper-recombinant but not hypermutant phenotype, showing that those two properties can occur independently. We were also interested on the antibiotic effects on recombination. The widespread use of antibiotics as therapeutic agents has produced a major challenge for bacteria, leading to the selection and spread of antibiotic resistant variants. However, antibiotics do not seem to be mere selectors of these variants. Here we show that two SOS-inducer antibiotics, ciprofloxacin and ceftazidime (affecting type II DNA-topoisomerases and PBP3, respectively) stimulate intrachromosomal recombination of both identical and divergent DNA sequences. This stimulation depends on RecA activity but, surprisingly, ciprofloxacin effect is independent of SOS induction. Analysis of the main *E.coli* recombination pathways show that stimulation of recombination occurs via either the RecBCD or RecFOR pathways. We show that these antibiotics also stimulate the conjugational recombination of an antibiotic resistance gene in *E.coli* and in the pathogen *P.aeruginosa*. Thus some antibiotics can increase genetic variation by the stimulation of the recombinogenic capability of treated bacteria and, consequently, may favor the acquisition, evolution and spread of antibiotic resistance determinants

ABREVIATURAS

(Orden alfabético)

A: Adenina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ATP: adenosina trifosfato

Antibiótico^R: Antibiótico resistente

Amp: Ampicilina

Ara: Arabinosa

C: Citosina

Cat y Cm: Cloranfenicol

Cip: Ciprofloxacino

Caz: Ceftazidima

CMI: Concentración mínima inhibidora

dATP: deoxiadenosina trifosfato

DO₆₀₀: Densidad óptica medida a 600nm

DSBs: Roturas de doble hebra de DNA (del inglés *double strand breaks*)

dsDNA: DNA de doble cadena (del inglés *double strand DNA*)

Dam: deoxiadenina metil-transferasa

DDMR: Sistema de reparación de emparejamientos erróneos dirigida por Dam (del inglés *Dam-directed mismatch-repair*)

G: Guanina

Gm: Gentamicina

GTP: guanosina trifosfato

GO: Oxoguanina

GMP: guanosina monofosfato

8-oxodG: 8-oxo-7,8-dihydroguanina

GFP: Proteína verde fluorescente (del inglés *Green fluorescent protein*)

His: Histidina

Hfr: Alta frecuencia de recombinación (del inglés *High frequency recombination*)

IRD: Indice de recombinación diferencial

Kan: Kanamicina

LB: Medio rico de cultivo Luria-Bertani

M9: Medio mínimo

MH: Medio rico de cultivo Mueller Hinton

MCS: Sitio de clonaje múltiple (del inglés *multiple cloning site*)

MDMR: Sistema de reparación de emparejamientos erróneos dependiente de metilación (del inglés *methyl-directed mismatch-repair*)

MMR: Sistema de reparación de emparejamientos erróneos (del inglés *mismatch repair*)

MEPS: Regiones mínimas necesarias para que el proceso de recombinación sea eficiente (del inglés *Minimum Efficient Processing Segment*)

Nal: Ácido Nalidíxico

NER: Sistema de reparación por escisión (del inglés *nucleotide escision repair*)

Ori: Origen de replicación

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *polimerase chain repaction*)

PBPs: Proteínas de unión a penicilina (del inglés *Penicillin binding proteins*)

Phleo: Bleomicina

Rif: Rifampicina

rpm: Revoluciones por minuto

RAPD: Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (del inglés *Randomly amplified polymorphic DNA*)

ssDNA: DNA de cadena simple (del inglés *single strand DNA*)

SSGs: Roturas de hebra simple de DNA (del inglés *single strand breaks*)

SD: Desviación estándar (del inglés *standard deviation*)

SSBs: Proteínas de unión a DNA de cadena simple (del inglés *single strand binding proteins*)

T: Timina

Tet: Tetraciclina

TLS: replicación a través de una lesión (del inglés *translesion DNA síntesis*)

Ufc: Unidades formadoras de colonias

UTI: infección del tracto urinario (del inglés *urinary tract infection*)

YFP: Proteína amarillo fluorescente (del inglés *Yellow fluorescent protein*)

1. Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN COMO MOTORES DE LA EVOLUCIÓN

La adaptación a diferentes ambientes es una necesidad común a todos los organismos. Los seres vivos están continuamente sometidos a situaciones de estrés ambiental y necesitan adaptarse a los cambios de su entorno para sobrevivir. Además, la capacidad de responder a nuevas y distintas condiciones ambientales les proporciona la oportunidad de colonizar nuevos nichos.

Las bacterias, como el resto de organismos, también necesitan adaptarse al estrés ambiental y son un buen modelo para estudiar los mecanismos de adaptación y evolución. Las bacterias tienen dos mecanismos diferentes de adaptación: sin cambio genético y con cambio genético. La adaptación sin cambio genético se da a través de mecanismos fisiológicos de respuesta inmediata y pre-programada y permite adaptarse a ciertos factores de estrés muy determinados como, por ejemplo, a cambios en la concentración salina o en la temperatura del medio. Los mecanismos de adaptación con cambio genético dan lugar a diversas poblaciones donde los alelos más aptos se fijan. Para generar variación genética hay tres estrategias principales que son: (i) pequeños cambios en la secuencia de nucleótidos del genoma, (ii) remodelaciones del propio genoma mediante recombinación y, (iii) adquisición de secuencias de DNA de otros organismos mediante transferencia horizontal.

Los principales mecanismos de transferencia horizontal son: la transformación, mediante la cual la bacteria adquiere DNA libre del medio, la conjugación, donde una bacteria donadora transfiere el DNA a la bacteria receptora mediante contacto directo, y la transducción, proceso por el que el DNA pasa de una bacteria a otra a través de un virus (bacteriófago). El tamaño del fragmento de DNA que se transfiere depende del mecanismo de transferencia. Mediante transformación la bacteria puede adquirir segmentos de DNA de varias kilobases (Kb), mediante transducción, fragmentos de 10 a 100 Kb y mediante conjugación, se pueden transferir regiones de miles de kilobases (Miller 1996).

Si la bacteria se encuentra en un ambiente en el que tiene una alta posibilidad de intercambio genético, la forma más rápida y eficaz que tiene para adaptarse a los cambios ambientales es a través de la adquisición de nuevos genes y funciones mediante transferencia horizontal. Pero si esta posibilidad no existe, la única opción que queda es la reorganización de su propio genoma, bien por mutación o por recombinación.

La mayoría de las mutaciones que se producen al azar son neutras o desfavorables (Drake *et al.*, 1998). Para evitar el efecto negativo de las mutaciones, la evolución ha diseñado una maquinaria de replicación y corrección capaz de reducir extremadamente los errores del proceso para que la tasa de mutación sea lo más baja posible (Leigh 1973). Sin embargo, la bacteria también necesita adaptarse a diferentes ambientes y para ello necesita generar cambios en su genoma a través de las mutaciones. Se necesita, por lo tanto, un compromiso óptimo entre la capacidad de mutar para adaptarse a los cambios y la necesidad de mantener la integridad del genoma (Drake 1991; Sniegowski *et al.*, 2000).

1.1.1. Incidencia de mutadores en el laboratorio y en la naturaleza

Una población bacteriana con una elevada tasa de mutación (mutadora) estaría en principio favorecida en ambientes cambiantes, dada su elevada capacidad para generar modificaciones en el genoma que le permitan adaptarse a dichos cambios. Sin embargo, si la población es asexual y demasiado pequeña, la acumulación de mutaciones deletéreas podría suponer la extinción. El proceso por el que los genomas de una población asexual acumulan mutaciones deletéreas de forma irreversible se denomina *Muller's ratchet* o “trinquete de Muller” (Muller 1964). Podía esperarse, por lo tanto, que fuese muy difícil encontrar mutadores en la naturaleza, pero no es así. Los primeros mutadores descubiertos en bacterias fueron encontrados en cepas de laboratorio (Treffers *et al.*, 1954; Miyake 1960) pero pronto se encontraron en aislados naturales (Jyssum 1960; Gross and Siegel 1981).

En poblaciones naturales aparecen con alta frecuencia bacterias con una elevada tasa de mutación espontánea. La mayoría de los mutadores espontáneos que aparecen, tanto en cepas de laboratorio como en cepas naturales, son defectivos en el sistema de reparación de emparejamientos erróneos o MMR (Leclerc *et al.*, 1996; Miller 1996; Matic *et al.*, 1997; Sniegowski 1997; Funchain *et al.*, 2001) aunque la deficiencia de otros sistemas de prevención y reparación de daños en el DNA también puede provocar un fenotipo mutador (Horst *et al.*, 1999). Dependiendo del tipo de función en la que son defectivos los mutantes, éstos pueden presentar un fenotipo mutador moderado (aproximadamente 10 veces superiores a la tasa de mutación normal) o fuerte (entre 100 y 1000 veces por encima de la tasa de mutación normal = hipermutadores) (Miller 1996). Está descrito que aproximadamente el 10% de los aislados naturales de *Escherichia coli* son mutadores, y de esos, el 1% son hipermutadores (Leclerc *et al.*, 1996; Matic *et al.*, 1997). Esto sugiere que en ciertas situaciones naturales, generalmente relacionadas con condiciones ambientales muy cambiantes, ser mutador confiere una ventaja selectiva. De hecho se ha demostrado, por

ejemplo, que este tipo de condiciones que favorecen una alta tasa de mutación se dan en el pulmón de pacientes fibrotico-quísticos infectados por *Pseudomonas aeruginosa* (Oliver *et al.*, 2000).

Existen datos experimentales que demuestran cómo pueden llegar los mutadores a dominar una población (Mao *et al.*, 1997). En el laboratorio, una población bacteriana de *E.coli* de 10^{10} células contiene una subpoblación de 10^5 mutadores (células por ejemplo con una tasa de mutación entre 100 y 1000 veces superior a la normal) que representa aproximadamente el 0,001% de la población (10^{-5}) (Mao *et al.*, 1997). Este porcentaje de mutadores representa aquellas células con alguna mutación que provoca pérdida de función en alguno de los genes responsables del fenotipo mutador. En su sistema experimental, Mao y colaboradores miden la aparición de mutadores a través de la reversión del fenotipo Lac⁻ a Lac⁺, que se da por la adición de una guanina a la secuencia G-G-G-G-G-G. Hay 5 genes responsables de una alta tasa de reversión del fenotipo (genes mutadores); *mutS*, *mutL*, *mutH* y *uvrD* (genes del MMR) y *mutD* (implicado en la corrección de errores de la DNA polimerasa III). El porcentaje de mutadores puede incrementarse notablemente con una simple selección del fenotipo mutante Lac⁺. Este fenotipo se da en un solo paso por un simple cambio de pauta de lectura con una frecuencia de $2-3 \times 10^{-7}$, es decir que en nuestra población de 10^{10} células habrá aproximadamente 2000-3000 Lac⁺. Esta mutación es unas 500 veces más probable en un mutador. Luego si la frecuencia de mutadores en nuestra población es de 10^{-5} , y estos tienen una tasa de mutación a Lac⁺ de 1×10^{-4} , la frecuencia de mutadores Lac⁺ en la población será de 1×10^{-9} ($10^{-5} \times 10^{-4}$), o lo que es lo mismo unas 10 células (0,5% de las Lac⁺). Por lo que, tras una primera selección, la proporción de mutadores en la población seleccionada pasa de ser un 0,001% a un 0,5% (10^{-2}). Sucesivas selecciones de mutadores pueden llegar a incrementar la proporción de mutantes hasta el 100% de la población (Mao *et al.*, 1997). Estos experimentos demuestran que las poblaciones expuestas a continuas fuerzas selectivas presentan un incremento en la proporción de mutadores.

Los alelos mutadores pueden jugar un importante papel en la evolución adaptativa. Al aumentar la posibilidad de aparición de mutaciones favorables, pueden fijarse y acelerar la tasa evolutiva, pero, ¿cómo prevalecen los alelos mutadores a pesar de la carga evolutiva que generan por la acumulación de mutaciones deletéreas? Diversos experimentos de competición entre estirpes hipermutadoras y normomutadores de *E.coli*, han demostrado que los hipermutadores acababan dominando la población tras varias generaciones (Cox and Gibson 1974). Sin embargo, los alelos mutadores no confieren por si mismos una ventaja. Chao y Cox lo demostraron en 1983 con experimentos de competición entre una estirpe mutadora

mutT y su cepa isogénica *mutT*⁺ (Chao *et al.*, 1983), y un año después, Tröbner y Piechocki en un experimento similar con un mutador *mutS* (Trobnier and Piechocki 1984). Años después Lenski, también comprobó que ninguno de los alelos mutadores, *mutS*, *mutL* y *uvrD* incrementaban el *fitness* de la bacteria en sus condiciones experimentales (Sniegowski *et al.*, 1997). Ya que los alelos mutadores no confieren por si mismos una ventaja, la fijación de los mismos puede ser explicada por un proceso descrito por Maynard Smith y Haigh en 1974, que recibe el nombre de Selección de segundo orden o *hitchhiking* (Smith and Haigh 1974). El fenómeno de *hitchhiking* consiste en que los alelos mutadores pueden ser fijados por asociación con las mutaciones favorables que ellos mismos han generado, y puede en parte explicar la alta prevalencia de mutadores en la naturaleza. El *hitchhiking*, sin embargo, depende en gran medida de que no se produzca intercambio genético entre los individuos (poblaciones asexuales), ya que en poblaciones sexuales los procesos de transferencia horizontal pueden separar el alelo mutador de la mutación beneficiosa al que estaba físicamente ligado (Tenaillon *et al.*, 2000).

1.1.2. Estrés antibiótico como modelo de estudio de la evolución adaptativa

Uno de los modelos más usados para estudiar la evolución adaptativa es el estrés antibiótico y el desarrollo de resistencias. Contrariamente a la idea original de que los antibióticos provocan la aparición de estirpes resistentes por cambios directos debido al estrés (herencia Lamarckiana), ciertos estudios, ya clásicos, revelaron que los antibióticos actúan favoreciendo la fijación de estirpes resistentes preexistentes en la población, que han adquirido resistencia por mutaciones que han sido seleccionadas (teoría neo-Darwinista). A través de experimentos de replicación en los que transferían aislados de *E.coli* de un sustrato a otro selectivo, Lederberg y Lederberg demostraron que las bacterias pueden adquirir resistencia a un antibiótico independientemente de su exposición al mismo (Lederberg and Lederberg 1952).

Existen, sin embargo, evidencias que indican que los antibióticos pueden promover indirectamente el desarrollo de resistencias a través de la selección de alelos mutadores. Como demostraron Mao *et al* en poblaciones de laboratorio, una selección simple o selecciones sucesivas con antibióticos, incrementan la proporción de mutadores en la población (Mao *et al.*, 1997). En este caso, los antibióticos no estarían por sí mismos seleccionando resistentes, pero incrementando la proporción de mutadores estarían indirectamente aumentando la capacidad de que la población seleccionada adquiriera resistencia a otros antibióticos.

Las bacterias pueden adquirir resistencia a un antibiótico mediante dos vías: mediante transferencia horizontal (adquiriendo genes de resistencia de otros organismos) o mediante mutaciones en diferentes sitios del cromosoma. La transferencia horizontal de genes de resistencia es quizá el mecanismo más importante de adquisición de resistencia en la naturaleza (De La Cruz and Davies 2000). Se ha visto incluso que los antibióticos son capaces de promover la transferencia horizontal de genes de resistencia (Hastings *et al.*, 2004; Ubeda *et al.*, 2005; Prudhomme *et al.*, 2006). La adquisición de resistencias por mutación, sin embargo, es especialmente frecuente para aquellos antibióticos en los que una mutación puntual en su diana en la célula o en sistemas de modificación o expulsión del mismo, es suficiente para que la bacteria se haga resistente. Esta forma de adquisición de resistencias por mutación se da también en bacterias que se encuentran en nichos aislados o que no poseen mecanismos de transferencia genética eficaces, como aparentemente ocurre con *Mycobacterium tuberculosis*.

La transferencia horizontal y la mutación pueden actuar de forma sinérgica, ya que mediante transferencia horizontal se pueden introducir nuevos alelos portadores de resistencia en una población, y mediante mutación, estos alelos pueden modificarse y producir variantes más resistentes. Éste podría ser el caso de algunos genes de resistencia como las β -lactamasas de espectro expandido (Blazquez *et al.*, 1995; Blazquez *et al.*, 2000).

Las bacterias podrían participar activamente en su propia evolución. Mediante la modificación de sus tasas de mutación y recombinación, pueden incrementar su tasa de evolución, y por lo tanto aumentar sus posibilidades de desarrollar resistencias a los antibióticos.

1.2. HIPERMUTADORES E HIPERRECOMBINADORES

1.2.1. Hipermutación estable

Hipermutación e hiperrecombinación son dos propiedades que van generalmente unidas en un mutador. Como se mencionó anteriormente, la mayoría de las estirpes mutadoras aisladas en el laboratorio y en la naturaleza son mutantes defectivos en el sistema MMR o sistema de reparación de emparejamientos erróneos dependiente de metilación Dam. Estas estirpes no sólo presentan una elevada tasa de mutación por su incapacidad de reparar los errores que se producen durante el proceso de replicación, sino que además presentan un fenotipo hiperrecombinador, ya que el sistema MMR también interviene en la edición de emparejamientos erróneos durante el proceso de recombinación. Cuando existe divergencia

entre las secuencias que recombinan las proteínas MutS y MutL se unen a los emparejamientos erróneos, abortando la formación del heteroduplex e impidiendo así la recombinación (Worth *et al.*, 1994). Por lo tanto, el fenotipo hiperrecombinador de un MMR⁻ afecta sólo a los procesos de recombinación homeóloga o de secuencias divergentes.

También existen estirpes mutadoras por alteraciones en otro tipo de sistemas de reparación o protección del DNA, como los mutantes defectivos en genes del sistema GO, encargado de prevenir y reparar las lesiones en el DNA ocasionadas por la incorporación de la 8-oxo-d-guanina. En este caso la bacteria presentaría un fenotipo mutador, pero no hiperrecombinador.

En estos mutadores defectivos en un gen o genes de algún sistema de reparación de DNA, el fenotipo mutador se caracteriza por ser heredable, por lo que estos hipermutadores reciben el nombre de hipermutadores estables.

La hipermutación estable en *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria meningitidis*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae*, se produce principalmente por alteraciones en el MMR (Leclerc *et al.*, 1996; Matic *et al.*, 1997; Oliver *et al.*, 2000; Bjorkholm *et al.*, 2001; Richardson and Stojiljkovic 2001; Oliver *et al.*, 2002; Watson *et al.*, 2004). Como se ha comentado previamente, aproximadamente el 1% de los aislados naturales de *E.coli* y *S.typhimurium* son hipermutadores defectivos en alguno de los genes de MMR y presentan una tasa de mutación entre 100 y 1000 veces mayor que la de una cepa salvaje (Miller 1996). También se han aislado mutantes en genes del sistema GO en la naturaleza. En 1981 se aisló un mutante de *E.coli* aparentemente deficiente en *mutT*, uno de los genes de este sistema (Gross and Siegel 1981), y recientemente se ha descrito un mutante *mutT* en una cepa hipermutadora de *P. aeruginosa* aislada de un paciente con fibrosis quística (43rd ESCMID Simposio internacional).

Además de mutaciones en genes del sistema MMR y del sistema GO, existen otros genes cuya deficiencia provoca un fenotipo hipermutador, como por ejemplo *mutD*, que se encarga de editar la actividad de la DNA polimerasa III. Esta polimerasa comete errores durante la replicación (en torno a un error por cada 100.000 nucleótidos copiados). Los errores son corregidos por la subunidad ϵ de la DNA polimerasa III (Echols and Goodman 1991), que está codificada por el gen *mutD* o *dnaQ*. Mutaciones en este gen conducen a un fenotipo hipermutador extremadamente fuerte y además producen una reducción de la tasa de crecimiento (Echols *et al.*, 1983). Este tipo de mutantes no se han encontrado en cepas naturales.

1.2.1.1. MMR o sistema de reparación de emparejamientos erróneos

El MMR es un sistema de reparación post-replicativo que reconoce y repara los errores producidos durante la replicación, como la incorporación de una base errónea o la creación de pequeñas inserciones o deleciones comprendidas entre 1 y 4 nucleótidos. Este sistema es capaz de discernir cuál es la hebra de nueva síntesis y asume que es en ella donde está el error (Parker and Marinus 1992). En *E.coli*, el DNA recién sintetizado se metila por la deoxiadenina metil-transferasa (Dam), que añade un radical metilo en posición N6 de la adenina de las secuencias GATC. Este proceso lleva cierto desfase con el proceso de replicación, por lo que la hebra recién sintetizada no está todavía metilada y por esto puede ser reconocida (Palmer and Marinus 1994). Debido a su dependencia de la metilación del DNA para reconocer la cadena de nueva síntesis y corregir en ella el error, este sistema se conoce también como sistema de reparación de emparejamientos erróneos dirigida por metilación (MDMR, del inglés *methyl-directed mismatch-repair*) o sistema de reparación de emparejamientos erróneos dirigida por Dam (DDMR, del inglés *Dam-directed mismatch-repair*). El funcionamiento del MMR se resume en la **figura 1**.

Las proteínas del MMR se identificaron por primera vez en *Streptococcus pneumoniae* (Claverys and Lacks 1986), pero el sistema más estudiado es el de *E.coli* (Modrich 1991). El MMR de *E.coli* está compuesto fundamentalmente por los genes *mutS*, *mutL*, *mutH* y *uvrD* (*mutU*). La falta o defecto en uno solo de estos genes produce en esta bacteria un fenotipo hipermutador e hiperrecombinador. Los genes del MMR afectados en las cepas hipermutadoras estudiadas de *E.coli* son, en orden decreciente de frecuencia, *mutS*, *mutL*, *mutH* y *uvrD*.

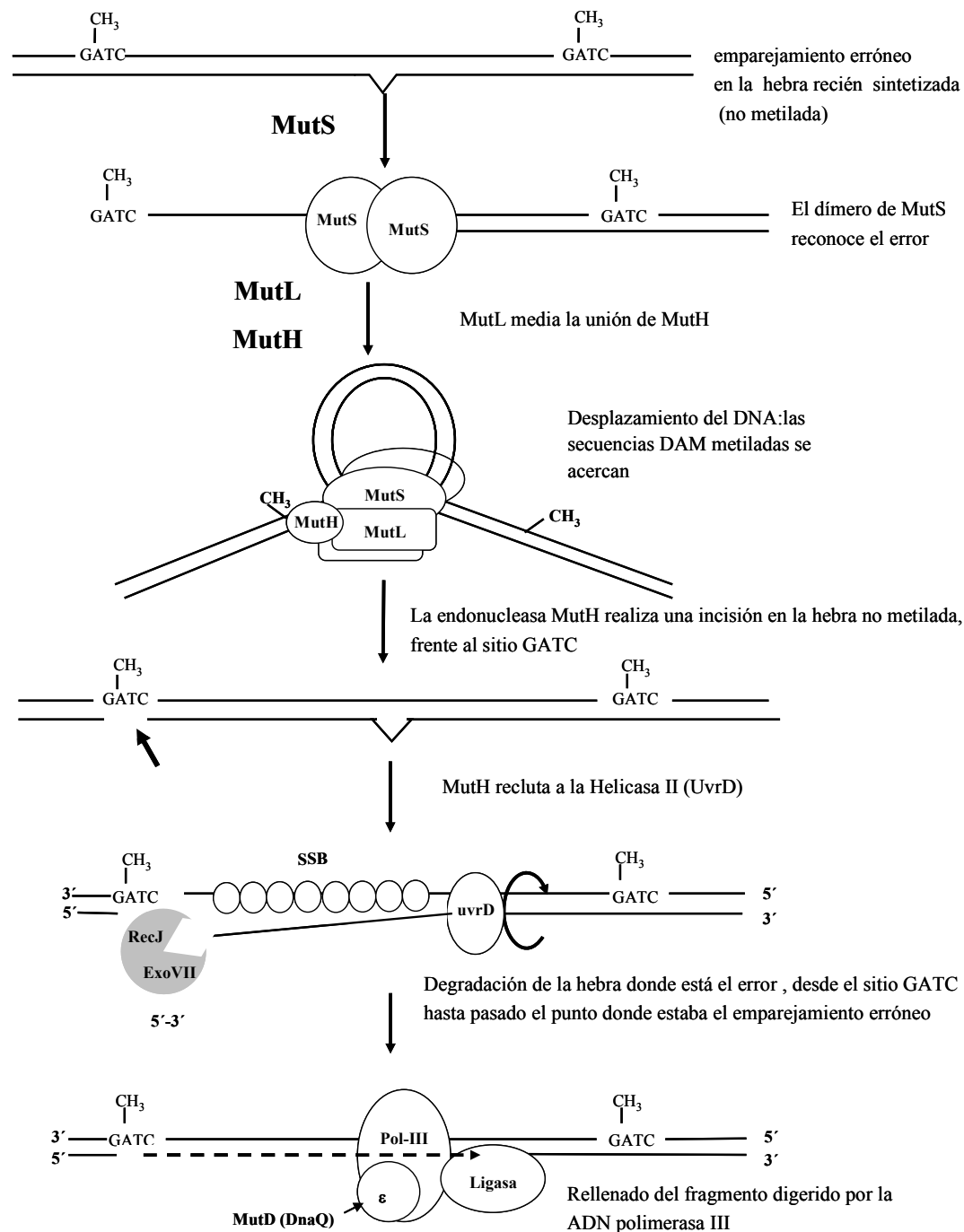


Fig. 1: Esquema del proceso de detección y reparación de los emparejamientos erróneos en *E. coli*. MutS reconoce y se une al emparejamiento erróneo. MutL es requerida para mediar la interacción entre MutS y MutH. MutH es una endonucleasa específica de metilación que corta la hebra no metilada frente a un sitio GATC. La helicasa UvrD separa las dos hebras y permite que entren las proteínas de unión a DNA de hebra simple (SSBs). A continuación las exonucleasas digieren el DNA desde el punto de corte hasta pasado el punto del emparejamiento erróneo y la DNA polimerasa III rellena el hueco producido. Finalmente la DNA ligasa sella la hebra. Aunque no se ha mostrado en la figura, la reparación del emparejamiento erróneo puede ser bidireccional.

1.2.1.2. Sistema GO

El sistema GO es el encargado de prevenir y reparar las lesiones en el DNA ocasionadas por radicales de oxígeno activos, especialmente las producidas por la incorporación de la 8-oxo-d-Guanina. Está compuesto por los genes *mutT*, *mutM* y *mutY*. La oxidación en posición 8 de la guanina (8-oxodG o GO) cuando está formando parte de la doble hebra de DNA, provoca que esta base de aparee frecuentemente con la adenina en lugar de con la citosina en el siguiente ciclo de replicación, provocando transversiones. Las proteínas MutM y MutY reparan este daño: MutM elimina la 8-oxodG cuando se encuentra enfrentada a una citosina en el DNA y MutY elimina la adenina de un emparejamiento erróneo G:A o 8-oxodG:A. La guanina, además de oxidarse a 8-oxodG cuando está formando parte del DNA, también puede hacerlo antes de incorporarse al DNA por oxidación del precursor dGTP. MutT es la proteína encargada de evitar que esto ocurra ya que convierte el 8-oxodGTP en 8-oxodGMP, impidiendo su incorporación al DNA (**figura 2**).

Las cepas deficientes en *mutM* presentan un fenotipo mutador débil y las deficientes en *mutY* presentan un fenotipo mutador moderado, pero los dobles mutantes en ambos genes y los mutantes *mutT* presentan un fenotipo mutador muy fuerte, con frecuencias de mutación de 100 a 1000 veces mayores de la normal (Cox 1976; Michaels *et al.*, 1992).

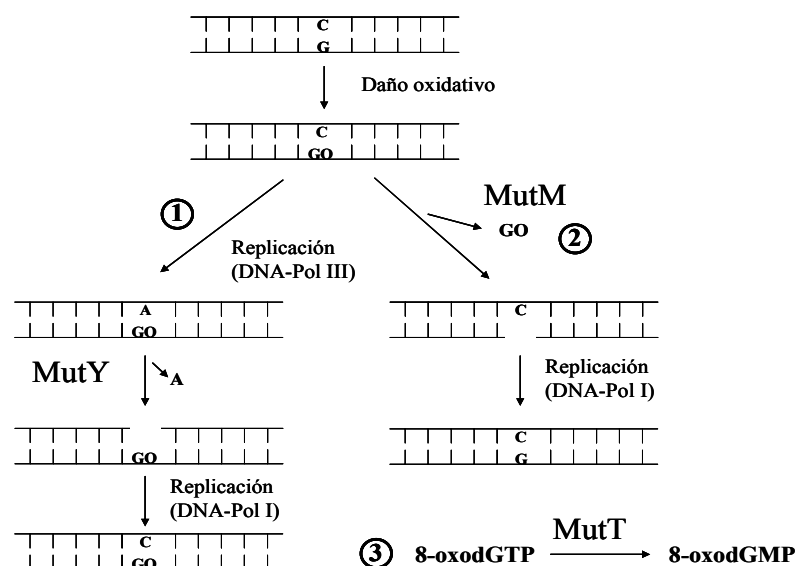


Fig. 2: Reparación y prevención de las lesiones 8-oxo-d-Guanina por el sistema GO. (1) MutY retira la adenina mal apareada enfrentada a una 8-oxo-d-Guanina (GO). (2) MutM retira la 8-oxodGuanina (GO). (3) MutT previene la incorporación en el DNA de 8-oxodGTP convirtiéndolo en 8-oxo-d-GMP.

1.2.1.3. Hipermutación estable como estrategia adaptativa

Cuando las bacterias se encuentran bajo fuertes presiones selectivas los hipermutadores pueden verse favorecidos y los alelos responsables de la hipermutación pueden seleccionarse gracias a las mutaciones favorables que generan (selección de segundo orden). Sin embargo, como se comentó anteriormente, la hipermutación estable como estrategia adaptativa está limitada a medio/largo plazo porque que las mutaciones producidas son principalmente neutras o desfavorables. Para *E.coli* K-12 la tasa de mutaciones deletéreas por genoma y por replicación es de $2-8 \times 10^{-4}$ (Kibota and Lynch 1996; Boe *et al.*, 2000), mientras que la de mutaciones beneficiosas es alrededor de 2×10^{-9} (Imhof and Schlotterer 2001). La acumulación de mutaciones desfavorables provoca la extinción de los alelos hipermutadores (Funchain *et al.*, 2000).

Una de las opciones de supervivencia de estos hipermutadores sería recuperar su tasa de mutación normal una vez adaptados. Para que esto ocurra hay varias posibilidades:

i) Si la alteración responsable del fenotipo hipermutador es una mutación puntual, lo más sencillo es que se produzca la reversión de esa mutación. Esta reversión estaría favorecida por la alta tasa de mutación del hipermutador, aunque este tipo de mutaciones se producen con baja frecuencia (De Visser 2002).

ii) Si el fenotipo hipermutador se debe a la falta o deficiencia de un gen determinado como por ejemplo *mutS*, la bacteria podría recuperar su tasa de mutación adquiriendo ese gen por transferencia horizontal. Existen evidencias de recombinación de genes del sistema MMR en cepas naturales de *E.coli* a través de mecanismos de transferencia horizontal, en concreto de *mutS* (Denamur *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 2001), que pueden sustentar la hipótesis de que la bacteria puede revertir su fenotipo mutador mediante este mecanismo. Además, el fenotipo hiperrecombinador que presentan estos hipermutadores defectivos en el MMR favorecería la posibilidad de que esto ocurriese.

iii) Una última posibilidad, es que existan genes o sistemas de “compensación” de la tasa de mutación. Este tipo de “compensación” ha sido descrita para una estirpe mutadora de *E.coli mutT* (Trobner and Piechocki 1984). En este estudio observaron que después crecer una población mutadora *mutT* en un quimiostato, las células aisladas tras 2200 generaciones presentaban menores frecuencias de mutación. Tras el análisis de estos aislados comprobaron que el alelo *mutT* no había cambiado, por lo que las bajas tasas de mutación tenían que ser debidas a mutaciones supresoras del fenotipo mutador. También se han obtenido en el laboratorio genes supresores de la hipermutación en mutantes defectivos en *mutL*. Se construyeron unos mutantes en el gen *dnaE*, que codifica para la subunidad α de la DNA

polimerasa III, que se caracterizaban por un incremento en la fidelidad de la replicación. Al probar estos mutantes en una estirpe *mutL* se observaba una disminución en la tasa de mutación en dicha estirpe (Fijalkowska *et al.*, 1993; Fijalkowska and Schaaper 1993).

La hipermutación estable como estrategia adaptativa no está solo limitada por la acumulación de mutaciones deletéreas. El estudio de poblaciones mutadoras que viven aisladas en un determinado entorno revela que pueden producirse mutaciones que son neutras en su entorno actual, pero que pueden resultar deletéreas en un ambiente diferente (Funchain *et al.*, 2000). Los mutadores pueden acumular rápidamente mutaciones que inactiven genes o funciones que no son necesarias en el entorno en el que se encuentran en ese momento, pero que pueden ser necesarias en futuros ambientes (término acuñado como “amnesia genética”) (Giraud *et al.*, 2001). Estos fenómenos pueden provocar la desaparición de los mutadores a largo plazo (Cooper and Lenski 2000).

1.2.2 Hipermutación transitoria. El Sistema SOS

Ya que la hipermutación estable es un mecanismo con un elevado coste evolutivo, la posibilidad de adquirir un fenotipo mutador sólo en condiciones de estrés supondría una clara ventaja frente a presentar un fenotipo mutador constante. Este tipo de hipermutación transitoria puede ocurrir a través del sistema SOS.

1.2.2.1. El sistema SOS

El sistema SOS es un regulón compuesto por más de 40 genes, que controla la respuesta frente a daños en el DNA (Radman 1975). Está controlado por las proteínas LexA y RecA. LexA es el represor del sistema. Es un polipéptido con 2 dominios: un dominio de dimerización y un dominio de unión al DNA (*DNA binding domain*) que se une al operador *upstream* de los genes SOS, bloqueando su transcripción (Luo *et al.*, 2001). La respuesta SOS se dispara cuando se producen daños en el DNA que provocan una parada en la replicación, como por ejemplo, rotura de hebra simple o doble. Esta parada del proceso de replicación produce la acumulación de DNA de cadena simple (ssDNA) en la bacteria, señal que la célula interpreta como daño en el DNA. La proteína RecA funciona como regulador positivo del sistema SOS. En presencia de dATP o de ATP, RecA forma filamentos en el ssDNA, adquiriendo actividad co-proteasa (RecA*) ayudando en la hidrólisis del represor LexA, el cual se separa en dos fragmentos polipeptídicos sin actividad, lo que produce la desrepresión del sistema y la transcripción de los genes del sistema SOS (Little *et al.*, 1980) (**figura 3**). El

control de la transcripción de *lexA* está muy finamente regulado, de manera que el nivel de respuesta SOS es proporcional al nivel de daño que se produce, evitando así falsos disparos de la respuesta que podrían producir una disminución en la tasa de crecimiento (Camas *et al.*, 2006). Además de RecA y LexA, se han descrito otros reguladores como DinI, que podría actuar como un regulador negativo modulando la inducción de la respuesta SOS al inhibir la autoproteólisis de LexA (Yasuda *et al.*, 1998).

Cuando se dispara la respuesta SOS se desencadena la expresión de múltiples genes que participan en la reparación, replicación, recombinación y división celular. Entre estos genes están:

i) Implicados en reparación por escisión (NER, del inglés *nucleotide excision repair*): *uvrD* (que codifica para la helicasa UvrD) y *uvrA* y *uvrC* (que codifican para las subunidades UvrA y UvrC de la nucleasa UvrABC). La reparación por escisión repara cualquier tipo de daño causado por radiación ultravioleta.

ii) Implicados en replicación: *polB*, *dinB* y *umuDC*, que codifican para las DNA polimerasas II, IV y V respectivamente. Estas polimerasas se caracterizan por su baja fidelidad en el proceso de replicación, lo que permite que puedan llevar a cabo la replicación incluso cuando el DNA molde se encuentra dañado.

iii) Implicados en recombinación:

- *recA*: codifica para la proteína RecA, que además de tener un papel fundamental en la regulación del sistema SOS es una de las principales proteínas implicadas en el proceso de recombinación homóloga.

- *recN*: codifica para la proteína RecN, que participa en la recombinación llevada a cabo por la vía RecFOR.

- *ruvAB*: codifica para las proteínas RuvA y RuvB, encargadas de la resolución de las estructuras de Holliday.

iv) Implicados en división celular:

- *sulA*: codifica para la proteína SulA, la cual inhibe la división celular al interactuar con FtsZ, proteína encargada del proceso de septación celular (Trusca *et al.*, 1998).

- *ftsK*: codifica para una DNA translocasa que coordina los procesos de segregación del cromosoma y de división celular (Liu *et al.*, 1998).

Además de la inducción de estos genes, cuando se induce el sistema SOS también puede inducirse la transcripción de otros genes extracromosómicos, como los que codifican para colicinas y microcinas (Gillor *et al.*, 2008).

Existen múltiples agentes que disparan la respuesta SOS en la bacteria. La mayoría provocan daños en el DNA. Alguno de estos agentes son la radiación ultravioleta, agentes químicos como la mitomicina C (agente alquilante que produce entrecruzamientos en el DNA) y ciertos antibióticos como las quinolonas. También se han descrito agentes capaces de inducir el sistema SOS sin causar aparentemente daños en el DNA, como la inducción mediada por altas presiones en *E.coli* (Aertsen *et al.*, 2004), o la inducción del SOS, de forma dependiente de cAMP, en condiciones de inanición (Taddei *et al.*, 1995).

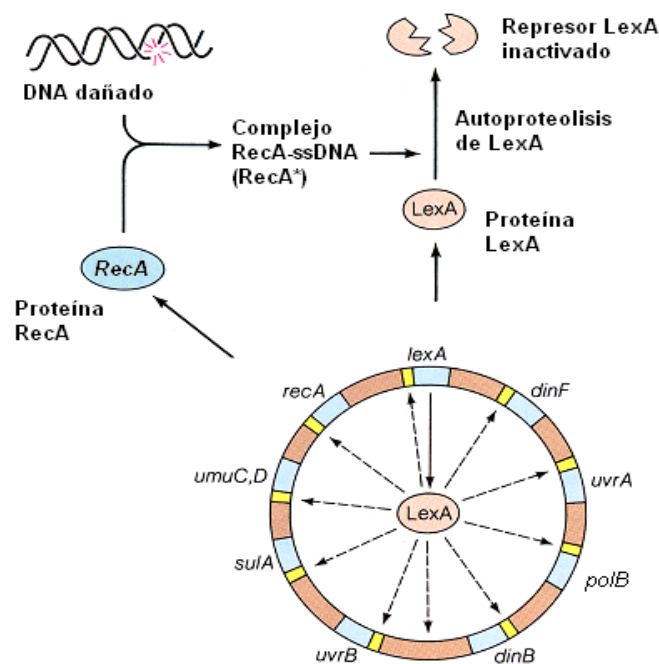


Fig. 3: Representación esquemática de la inducción del sistema SOS. Cuando se producen daños en el DNA o la replicación del DNA se bloquea se acumula DNA de cadena simple (ssDNA). La proteína RecA se une al ssDNA formando el complejo RecA* el cual ayuda en la hidrólisis de LexA, que deja de ejercer su función represora permitiendo la transcripción de los genes SOS.

1.2.2.2. Mutagénesis SOS

Cuando se producen daños en el DNA y se bloquea la DNA polimerasa III, la bacteria necesita reestablecer el proceso de replicación para sobrevivir. A través de la inducción de la respuesta SOS se expresan los genes que codifican para las DNA polimerasas II, IV y V, denominadas también “DNA polimerasas propensas a error”. Estas polimerasas son capaces de continuar el proceso de replicación aunque el DNA molde esté muy dañado, pero como son de baja fidelidad introducen errores durante el proceso y generan mutaciones. Este

mecanismo de replicación a través de una lesión recibe el nombre de TLS, del inglés *translesion DNA synthesis* (Sutton *et al.*, 2000). Gracias a este mecanismo la bacteria es capaz de sobrevivir a los daños en el DNA, pero a cambio sufren el coste de una elevada tasa de mutación.

Este tipo de hipermutadores transitorios tienen una clara ventaja con respecto a los hipermutadores estables: cuando el agente que causa los daños en el DNA desaparece la bacteria recupera la tasa de mutación normal, de manera que se ve favorecida por su alta tasa de mutación sólo cuando lo necesita.

1.2.2.3. Antibióticos inductores del Sistema SOS

Se han descrito varios grupos de antibióticos capaces de inducir la respuesta SOS en la bacteria. Entre ellos, uno de los más estudiados es el grupo de las quinolonas. Tanto las quinolonas de primera generación (ácido nalidíxico) como las de generaciones posteriores (fluoroquinolonas) funcionan como inductores de la respuesta SOS (Ysern *et al.*, 1990). Dentro del grupo de las fluoroquinolonas destacan el norfloxacin, ofloxacin, enoxacin y ciprofloxacino por sus características potencialmente importantes en clínica (Hooper and Wolfson 1985). Las dianas de las quinolonas en *E. coli* son la DNA girasa (topoisomerasa II) y la topoisomerasa IV. Estas moléculas regulan la tensión del DNA a través de cortes transitorios, manteniéndolo en un estado adecuado de enrollamiento, tanto en las regiones cromosómicas que se están replicando como en las que están sin actividad de replicación.

Las quinolonas se unen a las topoisomerasas formando un complejo quinolona-topoisomerasa-DNA. Estos complejos se denominan *cleavage complexes* y contienen en su interior DNA roto y estabilizado por la topoisomerasa. Cuando se alcanzan concentraciones bacteriolíticas de antibiótico en la bacteria, los extremos de DNA rotos se liberan de los *cleavage complexes* y se produce la muerte celular (Drlica and Zhao 1997).

Las quinolonas son potentes inductores del sistema SOS. El mecanismo de inducción del SOS mediado por estas moléculas requiere de la nucleasa/helicasa RecBCD (Newmark *et al.*, 2005). Cuando se forman los *cleavage complexes* por el bloqueo de las topoisomerasas mediado por quinolonas, se produce una parada de la replicación. Esto provoca la rotura de DNA de doble cadena. Estas roturas son procesadas por RecBCD. En este proceso se genera DNA de cadena simple (ssDNA) donde filamenta RecA y se forma el complejo RecA*, el cual, como ya se ha explicado, es necesario para inducir la respuesta SOS.

Otros antibióticos, como los β -lactámicos, también inducen la respuesta SOS. Entre ellos destacan las cefalosporinas, como la ceftazidima (Caz), cuyo efecto en la inducción del

SOS se ha estudiado tanto en *E.coli* como en *P.aeruginosa* (Perez-Capilla *et al.*, 2005; Blazquez *et al.*, 2006). Los β -lactámicos inhiben la síntesis de la pared celular. Sus dianas en la bacteria son las proteínas de unión a penicilina, PBPs (del inglés *Penicillin binding proteins*). Estas proteínas son transpeptidasas implicadas la síntesis del peptidoglicano, principal componente de la pared celular (Matsushashi *et al.*, 1990). La PBP3 (proteína codificada por el gen *ftsI*), es una peptidoglican sintetasa que juega un papel esencial en la formación del septo durante la división celular (Ishino and Matsushashi 1981) y es la principal diana de algunos β -lactámicos como la ceftazidima. Se ha descrito que los β -lactámicos que inactivan la proteína PBP3 son capaces de desencadenar la respuesta SOS a través de un sistema de dos componenetes (DpiBA). En este sistema DpiA es el efector, el cual se sobreexpresa por la unión del β -lactámico a PBP3. Cuando esto ocurre se interrumpe la replicación del DNA (por su unión a secuencias ricas en AT en el origen de replicación), lo que dispara la respuesta SOS (Miller *et al.*, 2004). Se ha descrito incluso que algunos β -lactámicos pueden inducir la expresión de genes del sistema SOS de forma independiente a la inducción de *recA* y *lexA*. Este sería en caso de la inducción de la transcripción de *dinB* (que codifica para la DNA polimerasa IV) por ceftazidima, fosfomicina, imipenem o aztreonam, de forma independiente a la inducción del sistema SOS (Perez-Capilla *et al.*, 2005).

También se ha descrito que otros antibióticos pueden ser inductores del SOS, como el trimetoprim, que interfiere en el metabolismo del ácido fólico (precursor de la síntesis de purinas, pirimidinas y aminoácidos) (Lewin and Amyes 1991).

Una de las características de los antibióticos que desencadenan la respuesta SOS en la bacteria es que producen filamentación. Las bacterias filantan por la inhibición del proceso de septación (debida a la inducción de *sulA*), pero no de elongación. En el caso de la ceftazidima, la filamentación se produce por la inhibición de la septación a través de PBP3 (Ishino and Matsushashi 1981), y ocurre independientemente de la inducción del SOS. Este proceso tiene la finalidad de impedir la segregación de células hijas con lesiones en el DNA pero además, según Miller *et al.*, al inhibirse la división celular disminuyen los efectos bactericidas de los β -lactámicos, que solo matan a las células que se encuentran en división (Miller *et al.*, 2004).

Los antibióticos inductores del sistema pueden incrementar la tasa de mutación de las bacterias expuestas a ellos a través del mecanismo de mutagénesis SOS o TLS explicado anteriormente. Se ha descrito, por ejemplo, que las quinolonas pueden incrementar la tasa de mutación de *S.typhimurium* (Ysern *et al.*, 1990), y que la ceftazidima incrementa la frecuencia de mutación (medida a través de la reversión del fenotipo Lac⁻ a Lac⁺) de *E.coli*, a través de la

DNA polimerasa IV (Perez-Capilla *et al.*, 2005). Este incremento en la frecuencia de mutación puede de aumentar la capacidad de las propias bacterias para adquirir resistencias.

1.3. MMR, SOS Y RECOMBINACIÓN

Como se mencionó anteriormente, la forma más rápida y eficaz que tiene una bacteria para adquirir nuevas funciones, y por lo tanto de adaptarse a cambios en el ambiente, es a través de la adquisición de genes mediante transferencia horizontal. Si el DNA que se transfiere de una bacteria a otra no es un plásmido, que tiene su propio origen de replicación y por lo tanto es autónomo, el DNA que entra debe recombinar con el cromosoma de la bacteria receptora. La eficiencia de recombinación, una vez que el DNA está dentro de la bacteria, depende; del tamaño y grado de identidad que comparten las moléculas de DNA que recombinan y de los mecanismos celulares encargados de llevar a cabo y de revisar el proceso de recombinación.

La principal proteína implicada en recombinación es RecA. Esta proteína funciona como una ATPasa DNA-dependiente que promueve: la sinapsis, la formación del heteroduplex y el intercambio de hebras. RecA necesita unas regiones mínimas de homología para poder llevar a cabo los estados iniciales del proceso de intercambio de hebras y que el proceso de recombinación sea eficiente. Estas regiones mínimas de homología necesarias se denominan MEPS, del inglés *Minimum Efficient Processing Segment* (Shen and Huang 1986). La recombinación *in-vivo*, por lo tanto, precisa de una alta homología entre las secuencias que recombinan. De hecho, una divergencia de entre un 10 y un 20% impide prácticamente que se lleve a cabo el proceso de recombinación (Shen and Huang 1986). Sin embargo, se sabe que *in-vitro* RecA es capaz de catalizar la formación del heteroduplex aunque la divergencia entre los DNAs que lo conforman sea de hasta un 30% (Dasgupta and Radding 1982). Esto significa que la proteína encargada de la fidelidad del proceso de recombinación no es RecA. Existen unas proteínas encargadas de estos procesos: las proteínas del MMR.

El proceso de intercambio de hebras, catalizado por RecA, está revisado por el MMR. Cuando existe divergencia entre las secuencias que recombinan, las proteínas MutS y MutL se unen a los emparejamientos erróneos del heteroduplex impidiendo la carga de RecA y abortando la formación del heteroduplex (Worth *et al.*, 1994).

1.3.1. Control de la barrera genética entre especies bacterianas: MMR y sistema SOS

El primer paso para que se produzca intercambio genético entre una bacteria y otra es la transferencia de DNA. Esta puede estar limitada por barreras físicas, como la entrada a través de la superficie celular, o por los sistemas de modificación y restricción de la bacteria receptora, que pueden degradar el DNA exógeno. Se ha comprobado, sin embargo, que este tipo de restricciones están lejos de ser las principales responsables de la barrera genética entre especies (Matic *et al.*, 1996). Experimentos de cruces entre especies de *S.typhimurium* y *E.coli*, han demostrado que el sistema de restricción tipo I de *E.coli* (codificado por el gen *hsdR*) no afecta significativamente ni a la transferencia de DNA por conjugación, ni al proceso de recombinación de un marcador simple entre *S.typhimurium* y *E.coli* (Matic *et al.*, 1995).

El MMR juega un papel fundamental en el control de la recombinación genética, impidiendo la recombinación entre moléculas de DNA divergentes. La actividad antirrecombinadora del MMR es la base de la barrera genética que existen entre diferentes especies bacterianas (Rayssiguier *et al.*, 1989). Este efecto inhibitorio de la recombinación de secuencias divergentes no sólo se ha visto en enterobacterias (Vulic *et al.*, 1997), también ocurre en especies Gram positivas, como *Bacillus* (Majewski and Cohan 1998) y *S. pneumoniae* (Majewski *et al.*, 2000), y en levaduras (Datta *et al.*, 1996).

El MMR también controla la frecuencia de reorganizaciones cromosómicas inhibiendo la recombinación intracromosómica de secuencias que incluso presentan sólo un 2% de divergencia a nivel de secuencia (Petit *et al.*, 1991). La proteína MutL juega un papel fundamental en el control de la recombinación. Los niveles celulares de esta proteína determinan la eficacia del proceso de recombinación entre secuencias repetidas (con un 4% de divergencia) dentro del genoma, de manera que menores niveles de MutL provocan mayores frecuencias de recombinación. Además, los mutantes caracterizados por bajos niveles celulares de MutL presentan un fenotipo hiperrecombinador pero no hipermutador, demostrando que las fluctuaciones en el nivel de esta proteína afectan sólo al proceso de *editing* del DNA en la recombinación, pero no al post-replicativo (Elez *et al.*, 2007).

En la **figura 4** se representan las frecuencias de recombinación resultado del cruce por conjugación entre distintas especies de donadores Hfr y receptores de *E.coli* K-12 (Vulic *et al.*, 1997). Como se observa en la figura, la frecuencia de recombinación entre bacterias de la misma especie (*E.coli* K-12 Hfr x *E.coli* K-12) es aproximadamente 1×10^{-1} . Una divergencia de sólo un 2% entre las secuencias que recombinan (cruce de *E.coli*B Hfr x *E.coli* K-12) provoca una bajada en la frecuencia de recombinación de casi 10 veces, y una divergencia de

un 4% (cruce *Shigella flexneri* Hfr x *E.coli* K-12) disminuye la frecuencia de recombinación casi 100 veces con respecto a la del cruce entre bacterias de la misma especie. El cruce entre *S.typhimurium* y *E.coli* es uno de los modelos más utilizados para estudiar la recombinación interespecífica. Estas dos bacterias presentan una divergencia genética de aproximadamente un 16%. Como se observa en la **figura 4**, la frecuencia de recombinación del cruce *S.typhimurium* x *E.coli* K-12 es de aproximadamente 10^{-6} , luego está casi 100.000 veces por debajo de la del cruce entre bacterias de la misma especie. Se puede decir por lo tanto, que existe una relación exponencial e inversamente proporcional entre la frecuencia de recombinación y la divergencia genómica. Esta relación se debe fundamentalmente al MMR. Si se realizan estos mismos experimentos utilizando como receptor una bacteria deficiente en MMR (un mutante *mutS*, por ejemplo), la frecuencia de recombinación entre *S.typhimurium* y *E.coli* aumenta hasta 1000 veces y si por el contrario se sobre-expresan las proteínas del MMR, la frecuencia de recombinación entre estas dos especies queda prácticamente abolida (Vulic *et al.*, 1997).

Además del MMR, existe otro sistema que controla el intercambio genético entre especies: el sistema SOS. Mientras que el MMR funcionaría como un potente inhibidor de la recombinación interespecies, el sistema SOS actúa como un regulador positivo inducible. El cruce interespecies dispara la respuesta SOS (de forma dependiente de RecBCD) en las bacterias receptoras y esto se traduce en un incremento en la capacidad de recombinación, presumiblemente debido a la sobreproducción de RecA (Matic *et al.*, 1995). Este disparo de la respuesta SOS se debe a que el DNA que entra en la bacteria receptora en forma de ssDNA se replica produciendo dsDNA. Los extremos del dsDNA son sustrato para RecBCD. El procesamiento de estos extremos por RecBCD genera DNA de cadena simple, donde filaminta RecA. Durante la conjugación interespecífica el número de MEPSs es limitado debido al grado de divergencia de los DNAs parentales y como consecuencia los complejos RecA-ssDNA tienen una vida media más larga, lo que resulta en la activación de la actividad coproteasa de recA (RecA*) originando la hidrólisis de LexA y desreprimiendo la expresión de los genes SOS. Durante la conjugación intraespecífica los complejos RecA-ssDNA tienen una vida media mucho menor, por lo que el sistema SOS no llega a dispararse a los mismos niveles que en la conjugación interespecies.

En un cruce entre especies diferentes, como el de *S.typhimurium* y *E.coli*, donde la bacteria receptora sea deficiente en MMR y tenga además disparada la respuesta SOS, las barreras genéticas que existen entre estas dos bacterias pueden prácticamente desaparecer (Matic *et al.*, 2000)

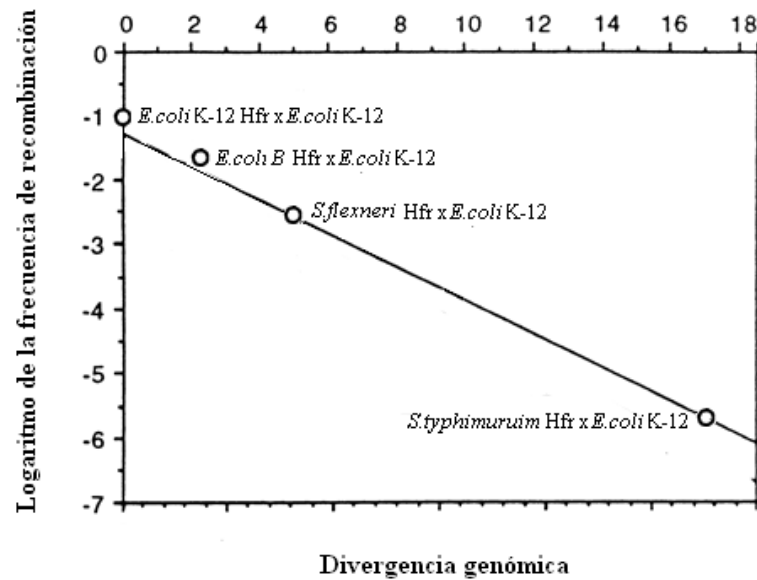


Fig. 4: Relación entre la frecuencia de recombinación y la divergencia genómica. Cada círculo representa la frecuencia de recombinación resultado del cruce por conjugación entre distintas especies Hfr x *E. coli* K-12. La frecuencia de recombinación disminuye de forma exponencial según aumenta la divergencia genómica entre las especies. (Modificado de (Vulic *et al.*, 1997)).

2. Hipótesis y Objetivos

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El presente trabajo consta de dos partes bien diferenciadas, pero ligadas por un nexo común: la recombinación.

2.1. Estudio de la recombinación en poblaciones naturales de *E.coli*.

La primera parte se centra en el estudio de la recombinación en poblaciones naturales de *E.coli*. Existen múltiples estudios sobre mutación en aislados naturales, pero se desconoce la capacidad de estos microorganismos para intercambiar información genética con otras bacterias mediante transferencia horizontal. Además hemos querido estudiar el vínculo entre las propiedades de mutación y recombinación en cepas naturales de *E.coli*, así como la relación de los niveles de expresión basal de dos genes del sistema SOS, *dinB* y *recA*, con las frecuencias de mutación y recombinación de dichas cepas.

Para la primera parte de este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

- Estudiar la frecuencia de mutación en poblaciones naturales de *E.coli*.
- Estudiar las frecuencias de conjugación y recombinación en poblaciones naturales de *E.coli*.
- Estudiar la expresión de genes del sistema SOS en dichas poblaciones.

2.2. Efecto de los antibióticos en la recombinación.

La segunda parte de este trabajo se propone explorar el efecto de los antibióticos en la recombinación. La hipótesis de partida propone que si un aumento de RecA (principal proteína implicada en el proceso de recombinación) implica un incremento en la recombinación, la exposición de la bacteria a ciertos antibióticos inductores del sistema SOS debería provocar también un incremento en la recombinación, ya que al inducirse el sistema SOS aumenta la concentración de RecA en la bacteria.

Partiendo de esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

- Estudiar el efecto de antibióticos inductores del sistema SOS en la recombinación intracromosómica en *E.coli*.
- Estudiar el efecto de antibióticos inductores del sistema SOS en la recombinación intercromosómica en *E.coli* y en *P.aeruginosa*.
- Estudiar el efecto de otros antibióticos en la recombinación en *E.coli*.

3. Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MEDIOS, REACTIVOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

Los medios y reactivos fueron preparados acorde con Miller (Miller 1992). Como medio de cultivo rico se empleó LB (triptona 10g/L, extracto de levadura 5 g/L, cloruro de sodio 5g/L) y como medio mínimo, M9 *Minimal Salts* (Sigma) suplementado con glicerol, glucosa o con lactosa como fuente de carbono. Para los cultivos en medio sólido se añadieron 15g/L de agar. Cuando fue necesario, los medios se suplementaron con antibióticos a las concentraciones indicadas en cada caso. Para la detección del fenotipo *lac*⁺ en medio sólido, se añadió a las placas 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-d-galactopyranoside (Xgal) e Isopropyl-B-D Thiogalactopyranoside (IPTG) a concentraciones de 40 mg/ml y 1 mM respectivamente.

Salvo que se indique lo contrario todas las estirpes de *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S. flexneri* y *S.thyphimurium* fueron crecidas en condiciones aeróbicas a 37°C. Las estirpes bacterianas se conservaron a -80°C en viales de LB-20% de glicerol.

3.2. CEPAS.

3.2.1. Cepas de laboratorio y plásmidos.

Las cepas bacterianas de laboratorio y los plásmidos utilizados en este trabajo se recogen en las siguientes **tablas 1 y 2**, junto con una breve descripción de los mismos

Tabla 1. Cepas bacterianas.

Cepa	Genotipo/Fenotipo relevante	Origen/Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
BW25113	$\Delta(araD-araB)567, \Delta lacZ4787(::rrnB-3),$ $\lambda da^-, rph-1, \Delta(rhaD-rhaB)568, hsdR514$ Cepa silvestre K-12. Secuenciada	NARA Institut ^a
MG1655	$F^-, \lambda da^-, rph-1$. Cepa silvestre K-12. Secuenciada	Stock del Laboratorio
DH5 α	$F^-, endA1, hsdR17 (r^-, m^+), supE44, thi1,$ $recA1, gyrA, relA1, D(lacZYA, argF)U169,$ $\emptyset 80 [D lacZM15]$	Stock del Laboratorio

NEC222	MG1655 <i>lacZΔT::cat. Scavenger cells</i> (Cm ^R)	Laboratorio de Ivan Matic
MG1655Δ <i>mutS::Kan</i>	Δ <i>mutS::Kan</i> . Hipermutadora (Kan ^R)	P1 (JW2703) x MG1655
MG1655Δ <i>mutS</i>	Δ <i>mutS</i>	Escisión del gen de resistencia a Kan en MG1655 Δ <i>mutS::Kan</i> (Baba <i>et al.</i> , 2006)
MG1655 Nal ^R	Mutante Nal ^R espontáneo de MG1655	Este estudio
MG1655Δ <i>mutS</i> Nal ^R	Mutante Nal ^R espontáneo de MG1655Δ <i>mutS</i>	Este estudio
MG1655 Rif ^R	Mutante Rif ^R espontáneo de MG1655	Este estudio
S17-1	<i>RecA pro (RP4-2Tet::Mu Kan::Tn7)</i>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
JW2703	BW25113Δ <i>mutS::Kan</i> (Kan ^R)	NARA Institut ^a
JW148	BW25113Δ <i>fhuD::Kan</i> (Kan ^R)	NARA Institut ^a
JW0941	BW25113Δ <i>sulA::Kan</i> (Kan ^R)	NARA Institut ^a
JWK0221	BW25113Δ <i>dinB::Kan</i> (Kan ^R)	NARA Institut ^a
JWK2669	BW25113Δ <i>recA::Kan</i> (Kan ^R)	NARA Institut ^a
P4X	Hfr	(Delmas and Matic 2005)
Ele-1	P4X Hfr Δ <i>fhuD::Kan</i> (Kan ^R)	P1 (JW0148) x P4X
XL1Blue MRF'	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i>] (Tet ^R)	Stratagen, USA
MG1655 Rif ^R F' Tn10	[F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i>] (Rif ^R , Tet ^R)	XL1Blue MRF' x MG1655 Rif ^R
ME12	MG1655 <i>lacZΔT-lacZΔP-yfp</i>	(Elez <i>et al.</i> , 2007)
ME12C	ME12 pero <i>lacZΔT</i> pertenece a <i>E. coli</i> CFT073	(Elez <i>et al.</i> , 2007)
ME12C <i>recA</i>	ME12C <i>recA938::Tn9-200</i> (Cm ^R)	(Elez <i>et al.</i> , 2007)
ME12C <i>lexA1</i>	ME12C <i>lexA1malB::Tn9</i> (Kan ^R)	(Elez <i>et al.</i> , 2007)
ME12C <i>mutS</i>	ME12C <i>mutS::cat</i> . Hipermutadora (Cm ^R)	(Elez <i>et al.</i> , 2007)
ME12C <i>recB</i>	ME12C <i>recB::phleo</i> (phleo ^R)	(Elez <i>et al.</i> , 2007)
ME12C <i>recF</i>	ME12C <i>recF::Tn5</i> (Kan ^R)	(Elez <i>et al.</i> , 2007)
ME12C <i>recB recF</i>	ME12C <i>recB::phleo recF::Tn5</i> (phleo ^R , Kan ^R)	(Elez <i>et al.</i> , 2007)
<i>Shigella flexneri</i>		
<i>S. flexneri</i> MM1	aislado clínico	M. Morosini
<i>S. flexneri</i> MM1	mutante Nal ^R espontáneo de <i>S. flexneri</i> MM1	Este estudio
<i>Salmonella typhimurium</i>		
LT2	Cepa silvestre de laboratorio	F. García del Portillo
LT2 Nal ^R	Mutante Nal ^R espontáneo de LT2	Este estudio
SA965	Hfr <i>leuBCD39 ara7</i> (Rif ^R)	Ivan Matic

SV4177	<i>hemL332::MudJ</i> (Kan ^R)	J.Casadesús
SA965-P22(<i>hemL</i>)	SA965 Hfr <i>hemL332::MudJ</i> (Kan ^R , Rif ^R)	P22 (SV4177) x SA965
SA965 Δ <i>fhuD::Kan</i>	SA965 Hfr Δ <i>fhuD::Kan</i> (Kan ^R)	Construida mediante la técnica de inactivación de genes cromosómicos utilizando productos de PCR (Datsenko and Wanner 2000)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	Cepa de laboratorio de referencia. Secuenciada	(Stover <i>et al.</i> , 2000)

^a obtenido de la base de genes: <http://ecoli.naist.jp>

Tabla 2. Plásmidos

Plásmido	Características	Origen/Referencia
pGEMT-Easy	Vector para clonar productos de PCR OriColE1	Promega
pKD46	<i>oriR101</i> , <i>repA101</i> (ts), <i>araBp-gam-bet-exo</i> (Red helper plasmid, Ts; Apr) (Amp ^R)	(Datsenko and Wanner 2000)
pKD4	<i>oriR</i> γ (Kan ^R , Amp ^R)	(Datsenko and Wanner 2000)
pSC101-Pless::GFP	pSC101 sin promotor clonado (Kan ^R) Plásmido de bajo número de copias	(Ronen <i>et al.</i> , 2002)
pSC101-PrecA::GFP	Fusión transcripcional GFP-promotor <i>recA</i> (Kan ^R)	(Ronen <i>et al.</i> , 2002)
pSC101-PdinB::GFP	Fusión transcripcional GFP-promotor <i>dinB</i> (Kan ^R)	Construido en este laboratorio
pSC101-PlacZ::GFP	Fusión transcripcional GFP-promotor <i>lacZ</i> (Kan ^R)	(Ronen <i>et al.</i> , 2002)
pEX100Tlink	<i>Apr sacB</i> . Vector para reemplazamiento génico con MCS	(Quenee <i>et al.</i> , 2005)
pEXTADGm	<i>ampD::Gm</i> clonado en pEX100Tlink. Plásmido suicida en <i>P.aeruginosa</i>	(Juan <i>et al.</i> , 2006)
pBR1MSC5-Gm	Derivado del pBBR1MCS. Replica en <i>P.aeruginosa</i> (Gm ^R)	(Kovach <i>et al.</i> , 1995)

3.2.2. Colecciones de cepas naturales.

Para realizar este estudio se utilizaron dos colecciones de aislados naturales de *E.coli* provenientes de seres humanos; una colección de cepas comensales (que forman parte de la flora microbiana normal del intestino) y una colección de cepas patógenas (causantes de diferentes tipos de enfermedades).

3.2.2.1. Colección de cepas Comensales.

Esta colección fue cedida por el laboratorio de Iván Matic (Facultad de Medicina, Universidad Rene Descartes-París, Francia). Parte de ella fue utilizada en su laboratorio para trabajos anteriores (Matic *et al.*, 1997; Bjedov *et al.*, 2003) . Nuestra colección consta de un total de 113 cepas, aislados de heces de seres humanos sanos, que fueron recogidas entre 1980 y 1990 e identificadas como *E.coli* a través del test API 20E (bioMérieux) (Duriez *et al.*, 2001). Cada una de las cepas fue aislada de un ser humano diferente. La colección se divide en dos grupos según la procedencia de las personas de las cuales se aislaron las cepas:

- Cepas comensales “Croacia”: 79 aislados de heces de seres humanos croatas
- Cepas comensales “Mali”: 34 aislados de heces de seres humanos malíes

Mediante la técnica de amplificación aleatoria del DNA polimórfico (RAPD) se comprobó en nuestro laboratorio que todas y cada una de las cepas de la colección eran diferentes, de decir, ninguna estaba repetida (ver material y métodos, apartado 3.4.4.).

3.2.2.2. Colección de cepas Patógenas.

Esta colección fue cedida por el laboratorio de Erick Denamur (Facultad de Medicina Xavier Bichat, Universidad ParísVII, Francia). Estas cepas también han sido estudiadas y analizadas en trabajos anteriores (Picard *et al.*, 1999). La colección consta de un total de 111 cepas aisladas de seres humanos que presentaban infecciones extraintestinales. Al igual que en el caso de la colección de cepas comensales, cada una de las cepas fue aislada de un ser humano diferente. La colección consta de 26 aislados de pus (proveniente de distintas infecciones que incluyen infecciones pulmonares y septicemia) y 85 aislados de infecciones del tracto urinario (UTI). Dentro de los 85 aislados de UTI se incluyen 11 cepas de la colección EcoR (*Escherichia coli Reference Collection*), colección establecida por Howard Ochman y Robert K.Selander en 1984 (Ochman and Selander 1984)

3.3. TÉCNICAS GENERALES DE GENÉTICA BACTERIANA.

Técnicas tales como obtención de células competentes y electrocompetentes, experimentos transformación por choque térmico o por electroporación, transducción con fagos, etc, se llevaron a cabo siguiendo básicamente las técnicas descritas por Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989) y Miller (Miller 1992)

3.4. TÉCNICAS DE DNA.

3.4.1. Técnicas generales.

Las técnicas generales como digestión con enzimas de restricción, electroforesis en geles de agarosa, ligación, etc. se realizaron siguiendo los protocolos previamente establecidos (Sambrook *et al.*, 1989). Para la preparación de DNA cromosómico y plasmídico, purificación de PCRs y de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa, se utilizaron los *Kits* comerciales de Qiagen y de Favorgen adecuados para cada caso.

Las reacciones de amplificación en cadena con DNA Polimerasa (PCR) de fragmentos de DNA se llevaron a cabo en condiciones similares: 0,2mM de cada deoxinucleótido (dNTP), 1,5mM de MgCl₂, 0,5μM de cada oligonucleótido y 1x del buffer adecuado para cada DNA polimerasa. Se utilizaron tres tipos diferentes de DNA polimerasas: *AmpliTaq Gold* (Roche), *Pwo* (Roche) y *GC-Rich* (Roche). Los programas de amplificación utilizados fueron los adecuados para cada una de las DNA polimerasas. En general constan de:

- a) un primer ciclo de desnaturalización inicial a 94°C,
- b) 35 ciclos de:
 - 30 segundos de desnaturalización a 94°C,
 - De 30 a 45 segundos de anillamiento a la temperatura de anillamiento adecuada de los oligonucleótidos
 - De 30 segundos a 3 minutos de elongación, dependiendo de la longitud del fragmento de DNA a amplificar, a 72°C,
- c) un último ciclo de extensión de 7 minutos a 72°C.

3.4.2. Secuenciación de DNA.

La secuenciación de plásmidos y productos de PCR se llevó a cabo en los Servicios de Secuenciación de Secugen (<http://www.secugen.es>) mediante el método de terminación de cadena por dideoxinucleótidos. Los oligonucleótidos utilizados para las reacciones de secuenciación se recogen en la **tabla 3**.

3.4.3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados por la empresa Sigma-Aldrich y se recogen en la **tabla 3**.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligo	Secuencia (5'→3')	Función
recA-1	GAAAGCGGCTCGTGCTGAT	Amplificación del gen <i>recA</i> de <i>E.coli</i> . Oligo directo
recA-3	GATCCAACAGGCGAGCATAT	Amplificación del gen <i>recA</i> de <i>E.coli</i> . Oligo reverso
fhuC-1	GGCGAACGTCAGCGGGCGT	Amplificación del gen <i>fhuD</i> de <i>E.coli</i> . Oligo directo
fhuB-2	GCCCAGAGCGTAGTGACGGT	Amplificación del gen <i>fhuD</i> de <i>E.coli</i> . Oligo reverso
hemL-1	ATCGCCAGCACCGCCGAA	Amplificación del gen <i>hemL</i> de <i>E.coli</i> . Oligo directo
hemL-2	TTTACCGCTGGGTGGTGATA	Amplificación del gen <i>hemL</i> de <i>E.coli</i> . Oligo reverso
Del-fhuD Salm-F	ATGCGTGATTTATATCCTCTT ACTCGCCGCCGTTTAGTGTA GGCTGGAGCTGCTTCG	Amplificación del gen de resistencia a Kan del plásmido pKD4. Lleva una extensión homología a los primeros 36nt del gen <i>fhuD</i> de Salmonella, el cual queremos deleccionar mediante la técnica descrita por Datsenko y Wanner (Datsenko and Wanner 2000). Oligo directo
Del-fhuD Salm-R	TCACGCTTTTCCTCCCAACA CGTTATCCAGGATGCGCATA TGAATATCCTCCTTAG	Amplificación del gen de resistencia a Kan del plásmido pKD4. Lleva una extensión homología a los últimos 36nt del gen <i>fhuD</i> de Salmonella, el cual queremos deleccionar mediante la técnica descrita por Datsenko y Wanner (Datsenko and Wanner 2000). Oligo reverso
fhuCsalm-F	CCGGCGGGCGCGGCACCT	Comprobación de la construcción de la cepa SA965 $\Delta fhuD::Kan$. Utilizando el oligo Del-fhuD Salm-R como oligo reverso amplifica el gen de Kan de esta cepa. Oligo directo
357f (16S)	CCTACGGGAGGCAGCAG	Amplificación del 16S rDNA. Oligo directo
907r (16S)	CCGTCAATTCCTTTGAGTTT	Amplificación del 16S rDNA. Oligo reverso
OPA-1 ¹	CAGGCCCTTC	Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD)
OPA-2 ¹	TGCCGAGCTG	Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD)
OPA-3 ¹	AGTCAGCCAC	Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD)

¹ Oligonucleótidos obtenidos de la casa comercial OPERON (<https://www.operon.com>). RAPD[®] 10mer Kits (KitA, A-01, A-02, A-03).

3.4.4. Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD)

La técnica de Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD, del inglés *Randomly amplified polymorphic DNA*) permite amplificar regiones desconocidas de ADN mediante el empleo de oligonucleótidos arbitrarios (Welsh and McClelland 1990; Williams *et al.*, 1990). Esta técnica, cuya eficacia ya se había demostrado estudios de epidemiología molecular en *E.coli* (Cave *et al.*, 1994), se utilizó para comprobar que todas y cada una de las cepas de la colección de comensales, eran diferentes.

Todas las reacciones de PCR para los RAPDs se llevaron a cabo en las mismas condiciones: 0,2mM de cada deoxinucleótido (dNTP), 2,5mM de MgCl₂, DMSO (10x), buffer *Taq gold* (1x), 100μM de cada oligonucleótido (Se combinaron varios oligos para aumentar la cantidad y variedad de bandas obtenidas en la PCR: OPA-2 + OPA-3 y OPA-1 + OPA-2) y 2,5U de la *AmpliTaq Gold* DNA polimerasa. Todas las PCRs se llevaron a cabo a partir de colonia. Se utilizó un programa de PCR estándar para esta DNA polimerasa (un primer ciclo de 12min a 94°C, 35ciclos de: 30seg a 94°C, 1min a 36°C, y 2min a 72°C y un último ciclo de 5min a 72°C). La baja temperatura de anillamiento (36°C) facilita la hibridación inespecífica de los oligos. El patrón de bandas se visualizó en un gel de agarosa al 1,5% corrido durante aproximadamente 3 horas a 100 V. Se comprobó que los patrones de bandas eran reproducibles y estables.

3.4.5. Análisis filogenético

Para confirmar la especie de ciertas cepas se secuenció una región de la subunidad ribosomal 16S utilizando los oligos 357f (16S) y 907r (16S) (**tabla3**). La secuencia del 16S rDNA está muy conservada a lo largo de la evolución y contiene regiones hipervariables que permiten identificar las bacterias a nivel de especie. La secuencia obtenida se analizó mediante el programa informático *geen genes* (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>) que contiene una base de datos del gen 16S rRNA con el que comparar la secuencia obtenida.

3.5. ESTUDIO DE LA RECOMBINACIÓN

3.5.1. Construcción de las cepas *lacZ* diploides.

Estas cepas fueron construidas por Marina Elez en el laboratorio de Ivan Matic. (Facultad de Medicina, Universidad Rene Descartes-Paris V, Francia) (Elez *et al.*, 2007).

Dos alelos no funcionales del gen *lacZ* fueron clonados en el cromosoma de *E.coli*, separados por 569pb. El primero tiene deleccionado el extremo C-terminal (*lacZ* 'ΔC) mientras que el segundo tiene deleccionado el extremo N-terminal (*lacZ*'ΔN). Los dos alelos tienen una región de DNA solapante de 1,3Kb. Esta región tiene una homología a nivel de secuencia de DNA del 100% en el caso de la cepa ME12 y del 96% en el caso de ME12C. El gen *lacZ* funcional puede reconstruirse por un simple evento de recombinación entre los dos fragmentos mencionados. La inserción del gen *yfp* que codifica para la proteína amarillo

fluorescente YFP (del inglés *Yellow fluorescent protein*) interfiere con la expresión del gen *lacY* por lo que se introdujo un gen *lacY* bajo un promotor *Plac-2* (**Fig. 5A**). Cuando se produce un evento de recombinación se incrementa la expresión del gen *yfp*, que antes de dicho evento era muy débil debido probablemente a la gran distancia entre el promotor *Plac* y el gen *yfp*. Esto puede ser observado al microscopio de fluorescencia (**Fig. 5B**)

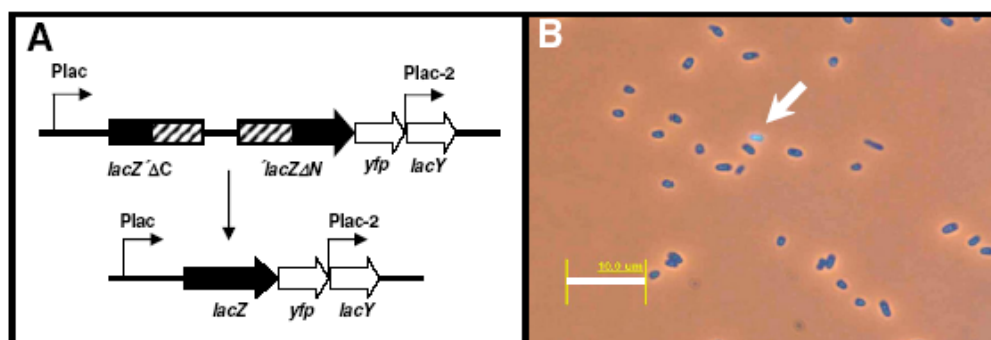


Fig. 5: A. Representación esquemática de las construcciones *lacZ* diploides mediante las cuales puede detectarse un evento de recombinación por la restauración de un gen *lacZ* funcional. *lacZ'ΔC* y *lacZΔN* (representadas en negro) son dos alelos no funcionales de *lacZ* que tienen deleccionado el extremo C-terminal y N-terminal respectivamente. Las cajas rayadas representan la región solapante de 1.3Kb. Un evento de recombinación entre los dos alelos *lacZ* reestablece un gen *lacZ* funcional. En blanco se representan los genes *yfp* y *lacY* que codifican para la proteína amarillo fluorescente YFP y para una lactosa permeasa LacY, respectivamente.

B. El evento de recombinación que reestablece el gen *lacZ* también puede visualizarse como células brillantes al microscopio de fluorescencia.

3.5.2. Estudio del efecto de los antibióticos en la recombinación intracromosómica.

Para medir la recombinación intercromosómica se utilizaron las cepas ME12, ME12C y derivados. Un evento de recombinación puede medirse por la reversión del fenotipo Lac⁻ a Lac⁺.

Un cultivo de la noche se diluyó para una DO₆₀₀ final de 0,1 en medio fresco LB. Este cultivo se creció 1 hora a 37°C sin agitación y se repartió en distintos tubos para tratar las bacterias con los antibióticos durante el tiempo que se estimó adecuado para cada antibiótico, a 37°C y con agitación (250rpm). Se utilizaron en todos los casos concentraciones subinhibidoras de antibiótico. Tras el tratamiento los cultivos se lavaron, se resuspendieron en medio fresco y se dejaron crecer durante la noche. De esta manera las bacterias se recuperan del tratamiento al que fueron sometidas, y en el caso en que fueron tratadas con antibióticos como Cip y Caz, se resuelven los filamentos que se forman como consecuencia

de dicho tratamiento (Blazquez *et al.*, 2006). Este paso es necesario porque la filamentación reduce el número de unidades formadoras de colonias (Mason *et al.*, 1995) mientras que se mantiene el número de posibles nucleoides recombinantes. Al día siguiente se lavaron los cultivos tres veces con 10 mM MgSO₄ para eliminar cualquier resto de fuente de carbono del medio en el que estaban, y se plaquearon sobre placas M9 con lactosa como única fuente de carbono. En este medio sólo podrán crecer aquellas bacterias en las que haya ocurrido un evento de recombinación y hayan adquirido un fenotipo Lac⁺. Para estimar el número de viables también se plaqueó en medio LB. La frecuencia de recombinación se calcula como el número de colonias Lac⁺ entre el número de viables. Los datos obtenidos son la media de, al menos, tres experimentos independientes.

3.5.3. Estudio del efecto de los antibióticos en la recombinación intercromosómica.

Para medir la recombinación intercromosómica se realizaron experimentos de conjugación. En estos experimentos las células receptoras se trataron con concentraciones subinhibidoras de antibiótico.

3.5.3.1. Experimentos de Conjugación en *E.coli*.

Un cultivo de la noche de las bacterias receptoras MG1655nal^R se diluyó para una DO₆₀₀ final de 0,1 en medio fresco LB. Este cultivo se creció 1 hora a 37°C sin agitación y se repartió en distintos tubos para tratar con los antibióticos. Estas células receptoras se trataron durante 4 horas, a 37°C y con agitación (250rpm), con concentraciones subinhibidoras de antibiótico (Cip o Caz), en medio LB. Tras las 4 horas, se lavaron los cultivos para eliminar el antibiótico y se resuspendieron en el mismo volumen de medio fresco. En este paso se plaquearon los viables de donador y receptor sobre LB. Donadores y receptores se mezclaron en proporción 1:1 en un tubo y se incubaron durante 1 hora a 37°C, sin agitación. Para parar el proceso se agitó con vortex durante 1 minuto. Los exconjugantes se plaquearon en medio LB con Nal y Kan (para los cruces con el donador Hfr Ele-1) o Tet (para los cruces con el donador F' MG1655 Rif^R F'). Las placas se incubaron 24 horas a 37°C. Las frecuencias de conjugación y recombinación se calcularon dividiendo el número de exconjugantes o recombinantes entre el número de donadores. Las frecuencias de conjugación y recombinación estimadas son el resultado de la media de al menos 3 experimentos independientes.

3.5.3.2. Experimentos de Conjugación en *P.aeruginosa*.

Un cultivo de la noche de las bacterias receptoras PAO1 se diluyó para una DO_{600} final de 0,1 ó 0,05, dependiendo del antibiótico utilizado en el experimento, Cip o Caz respectivamente, en medio fresco LB, y se creció durante 1 hora a 37°C con agitación (250rpm). Los receptores se trataron con concentraciones subinhibidoras de antibiótico (Cip o Caz) en medio LB durante 3 horas, a 37°C y con agitación. Tras las 3 horas, se lavaron los cultivos para eliminar el antibiótico. Un cultivo de la noche de las bacterias donadoras (*E.coli* S17.1 (pEXTADGm) para experimentos en los que medimos las frecuencias de recombinación o *E.coli* S17.1 (pBR1MSC5-Gm) para los experimentos en los que medimos las frecuencias de conjugación) se diluyó 1/20 en medio fresco LB y se incubó 2 horas a 37°C con agitación. Los viables de donador y receptor se plaquearon sobre LB. Donadores y receptores se mezclaron en un número aproximadamente igual de células (5×10^7 - 1×10^8) y se concentraron en 200µl de solución salina. Esta mezcla se depositó haciendo un botón sobre placas de LB y se incubó durante 5 horas a 37°C. Los botones se recogieron y se resuspendieron en 1ml de solución salina y se plaquearon diluciones adecuadas en MH-Gm (30µg/ml)-CTX (1µg/ml). Las placas se incubaron 24 horas a 37°C. La frecuencia de recombinación y de conjugación se calculó como el número de colonias Gm-CTX viables entre el número de donadores. Los datos obtenidos son media de al menos tres experimentos independientes.

3.5.4. Frecuencias de recombinación inter e intraespecíficas de las cepas comensales y patógenas de *E.coli*.

Para estudiar las frecuencias de recombinación de las colecciones de cepas comensales y patógenas de *E.coli* se utilizaron experimentos de conjugación en los que se cruzaron tres tipos diferentes de cepas donadoras (*E.coli* Hfr Ele-1, *S.typhimurium* SA965 Hfr *hemL::kan* y *E.coli* MG1655 Rif^R F'Tn10) con un mutante espontáneo resistente a ácido nalidíxico de cada una de las cepas de la colección. Estos mutantes espontáneos se obtuvieron plaqueando aproximadamente 1×10^9 células de un cultivo en fase estacionaria sobre placas de LB-ac.nalidíxico (40µg/ml).

Un cultivo de la noche de las bacterias donadoras y receptoras se diluyó hasta una DO_{600} final de 0,1 en medio fresco LB, y se creció durante 2 horas a 37°C, sin agitación en el caso de los donadores y con agitación (250rpm) en el caso de los receptores. Transcurridas 2 horas se plaquearon diferentes diluciones de ambos en placas de LB para el recuento de

viables. Se mezclaron aproximadamente 1×10^7 bacterias donadoras con 1×10^8 bacterias receptoras y se incubaron en un tubo durante 1 hora a 37°C , sin agitación. Para parar el proceso de conjugación se agitó con vortex durante 1 minuto. Los exconjugantes se plaquearon en medio LB con Nal y Kan (para los cruces con los donadores Hfr Ele-1 y SA965 *hemL::kan*) o Tet (para los cruces con el donador MG1655 *Rif^R F'Tn10*). Las placas se incubaron 24 horas a 37°C . Las frecuencias de conjugación y recombinación se calcularon dividiendo el número de exconjugantes o recombinantes, entre el número de donadores. Las frecuencias de conjugación y recombinación estimadas para cada cepa son el resultado de la media de al menos 3 experimentos independientes.

3.6. DETERMINACIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE MUTACIÓN.

Las frecuencias de mutación se calcularon midiendo la aparición de mutantes espontáneos resistentes a rifampicina ($100\mu\text{g/ml}$). La rifampicina es un inhibidor de la RNA polimerasa (se une a la subunidad β de la RNA polimerasa) y por lo tanto bloquea la transcripción. Una simple mutación puntual en el gen *rpoB*, que codifica para la subunidad β de la RNA polimerasa, es suficiente para adquirir resistencia a rifampicina, lo que hace de este antibiótico una buena herramienta para medir la mutación de una bacteria. Se resuspendieron tres colonias independientes en tubos con 2ml de LB y se crecieron durante la noche a 37°C con agitación (250rpm). Una dilución 10^{-6} (aproximadamente 1×10^2 células) se repartió en 3 tubos (5ml/tubo) y se incubaron durante la noche a 37°C con agitación. Se plaquearon diluciones adecuadas de cada cultivo en LB para el recuento de viables y se concentraron por centrifugación. Para el recuento de mutantes se plasmó la totalidad del cultivo en rifampicina. El recuento de colonias se realizó tras 24 horas de incubación a 37°C . La frecuencia de mutación se definió como la proporción de colonias mutantes respecto al total de células viables. La frecuencia de mutación estimada para cada cepa es el resultado de la media de 3 experimentos independientes.

La frecuencia de mutación rifampicina de la cepa salvaje de laboratorio *E.coli* K-12 MG1655 ha sido calculada en nuestro estudio y coincidiendo prácticamente con la definida previamente por otros autores es de $\sim 1 \times 10^{-8}$ (Matic *et al.*, 1997). En nuestro trabajo se consideró una cepa de *E.coli* como mutadora cuando su frecuencia de mutación media fue al menos 10 veces superior a la cepa de laboratorio MG1655 y como hipermutadora cuando su frecuencia de mutación media fue al menos 100 veces superior. Una cepa fue considerada como hipomutadora cuando su frecuencia de mutación media fue al menos 10 veces inferior a

la cepa de laboratorio MG1655. Las cepas que no cayeron en ninguno de estos rangos fueron consideradas como normomutadoras.

3.7. ESTUDIO DE LA TRANSCRIPCIÓN DE GENES DEL SISTEMA SOS.

Para estudiar la transcripción de genes del sistema SOS se utilizó el plásmido de bajo número de copias pSC101. Dicho plásmido contiene el gen *gfp-mut3*, que codifica para una proteína verde fluorescente GFP (del inglés *Green fluorescent protein*) de baja estabilidad, pero sin promotor (Ronen *et al.*, 2002). Los plásmidos pSC101-*PrecA::GFP* (Ronen *et al.*, 2002) y pSC101-*PdinB::GFP* (Jesús Blázquez, no publicado), portan sendas fusiones transcripcionales de los promotores de los genes *recA* y *dinB* de *E. coli* K-12 MG1655 con el gen *gfp-mut3*. Con estos plásmidos puede medirse, de forma indirecta a través de la fluorescencia de la proteína GFP, la transcripción de los citados genes. Los plásmidos se introdujeron por transformación, y selección en kanamicina, en las cepas de interés. Como controles se utilizaron los plásmidos pSC101-*Pless::GFP*, en el no se ha introducido promotor alguno y nos permite eliminar el fondo de fluorescencia generada por la expresión basal de *gfp* desde algún promotor lejano, y pSC101-*PlacZ::GFP*, en el que la transcripción de GFP está dirigida por el promotor del gen *lacZ* (Ronen *et al.*, 2002).

Para obtener el dato de transcripción de un gen mediante este sistema se mide la absorbancia a 595 nm y la fluorescencia a 495 nm en un fluorímetro. Los valores de fluorescencia se normalizan con los de absorbancia. Para obtener el dato final se normaliza la medida obtenida de las células que portan los vectores con promotor con el mismo resultado de las que portan el plásmido pSC101- *Pless::GFP*.

3.7.1. Estudio de la transcripción de *recA* y *dinB* en las cepas de la colección de comensales de *E.coli*.

Los plásmidos se introdujeron en cada una de las cepas de la colección de cepas comensales de Croacia. Se estudiaron tanto los niveles de expresión basales como los inducidos. Para inducir el sistema SOS se utilizó ciprofloxacino (0,12µg/ml). Como control de inducción de un gen que no pertenece al regulón SOS se utilizó IPTG para inducir la transcripción de *lacZ::gfp*. Para medir la transcripción de *recA*, *dinB* y *lacZ* se crecieron las bacterias con el plásmido correspondiente durante la noche en placa multipocillo y al día siguiente se inocularon 6µl de bacterias en 150µl de M9-glicerol 0,4%- Kan (50µg/ml), también en placas multipocillo, y se crecieron 1 hora a 37°C, sin agitación. A continuación, en

aquellos cultivos donde se quiso inducir el sistema SOS, se añadió ciprofloxacino a una concentración final de 0,12 µg/ml. Se tomaron medidas a las 4 y 24 horas. Cada dato de nivel de expresión es el resultado de la media de 3 experimentos independientes.

3.8. TINCIÓN VITAL (LIVE/ DEAD) Y DAPI.

Para la tinción vital se utilizó un kit (Live/dead® BacLight bacterial viability kit L-7012) que contiene dos colorantes fluorescentes: SYTO 9 que tiñe los ácidos nucleicos de las células de verde fluorescente, y yoduro de propidio que sólo penetra en las células que tienen dañada su membrana y las tiñe de color rojo. Al teñir con ambos colorantes, las células que se asumen como vivas (sin daños en la membrana) se tiñen de verde y las que se asumen como muertas (con la membrana dañada) se tiñen de rojo. Estos colores se observan con un microscopio de fluorescencia.

El 4',6-Diamidino-2-fenil indol diclorhidrato (DAPI) es un colorante fluorescente que pertenece al grupo de los colorantes de indol. Esta sustancia puede atravesar la membrana intacta de una bacteria y se une al DNA de forma que permite ver los nucleoides de las células como puntos fluorescentes cuando las bacterias se observan con el microscopio de fluorescencia.

3.9. CÁLCULO DE LA CMI.

La CMI o concentración mínima inhibidora se define como la concentración mínima de un antibiótico expresada en µg/ml que inhibe el crecimiento de un microorganismo in-vitro. Las CMIs se calcularon mediante el método de microdilución en caldo utilizando placas multipocillo (Nunc U96 MicroWell™ Plates) siguiendo las directrices recomendadas por el “*National Committee for Clinical Laboratory Standards*” (NCCLS, 2000). Para reproducir las condiciones de los experimentos de medida del efecto de los antibióticos en la recombinación, las condiciones del inóculo que se puso para calcular las CMIs de estos antibióticos, fueron las mismas que en los experimentos.

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa STATGRAPHICS Plus.

Para el análisis del efecto del tratamiento con antibióticos en la recombinación se utilizó el test de Kruskal-Wallis. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$.

Para analizar la correlación entre dos variables se utilizó un análisis de regresión (ajuste a una ecuación lineal). Se consideró estadísticamente significativa una dependencia de las variables con un valor de $p < 0,05$.

Las diferencias en la proporción de dos categorías diferentes fueron estadísticamente evaluadas utilizando el test de Mann-Whitney.

4. Resultados

Capítulo 1

Estudio de la recombinación en cepas naturales
de *E.coli*

4. RESULTADOS

Capítulo 1: Estudio de la recombinación en cepas naturales de *E.coli*

4.1. TIPACIÓN MOLECULAR POR RAPD DE LAS CEPAS COMENSALES DE *E.coli*.

Los 113 aislados de la colección de cepas comensales de *E.coli* se tiparon mediante RAPD con el objetivo de verificar que todas las cepas de la colección eran diferentes. Los patrones de electroforesis fueron comparados teniendo en cuenta dos parámetros: la distribución y la intensidad de las bandas detectadas. Aunque muchas bandas eran comunes a muchas de las cepas, otras eran únicas de una sola cepa o grupo de cepas. De las 113 estirpes de la colección, 84 presentaban un patrón de bandas único para cada una de ellas y el resto (29 cepas) se agrupaban en 9 grupos, en cada uno de los cuales el patrón de bandas, obtenido con la amplificación con diferentes oligos arbitrarios (OPA-1, OPA-2 y OPA-3), se repetía. De estos 9 grupos, 7 estaban formados por dos cepas, 1 por tres cepas y un último grupo estaba formado por 12 cepas. Se comprobó que las cepas pertenecientes a cada grupo eran al menos fenotípicamente distintas (crecimiento, frecuencias de mutación, conjugación, recombinación y aspecto visual de las colonias). También se utilizaron datos sobre los grupos filogenéticos (Herzer *et al.*, 1990) previamente conocidos obtenidos en el laboratorio del Dr. Denamur (A, B1, B2 o D, comunicación personal) para diferenciar alguna de las cepas que se encontraban en el mismo grupo RAPD.

4.2. ESTUDIO DE LA FRECUENCIA DE MUTACIÓN EN CEPAS COMENSALES DE *E.coli*.

Se estudiaron las frecuencias de mutación de todas las cepas de la colección midiendo la aparición de mutantes espontáneos resistentes a rifampicina. Previamente se comprobó que ninguna cepa era resistente natural a este antibiótico.

En el apartado 7 del bloque material y métodos se definen los rangos de frecuencia de mutación en los cuales una cepa se define como hipermutadora, mutadora, normomutadora o hipomutadora. En este estudio la frecuencia de mutación de nuestra cepa control *E.coli* K-12 MG1655 fue de $1,07 \times 10^{-8}$.

En un trabajo anterior, con una colección que incluía parte de nuestras cepas, se identificó la base molecular de alguno de los mutadores encontrados en nuestro estudio a través de estudios de complementación y *Southern blotting* (Picard *et al.*, 2001).

De los 113 aislados de cepas comensales de *E.coli*, 107 (94,7%) presentaban fenotipo normomutador y 4 (3,53%) presentaban fenotipo mutador. De esas 4 cepas, 3 de ellas eran hipermutadoras (2,65% del total). Uno de los mutadores (señalado en la **figura 6**) fue caracterizado como MMR⁻ (*mutS*) (Picard *et al.*, 2001). Además, del total de cepas comensales, 5 (4,42%) presentaban fenotipo hipomutador. La frecuencia de mutación media de las cepas normomutadoras fue de $1,31 \times 10^{-8}$, la de las cepas mutadoras fue de $6,31 \times 10^{-6}$ y la de las cepas hipomutadoras de $9,89 \times 10^{-10}$. Las frecuencias de mutación de las cepas comensales se encuentran reflejadas en la **figura 6**.

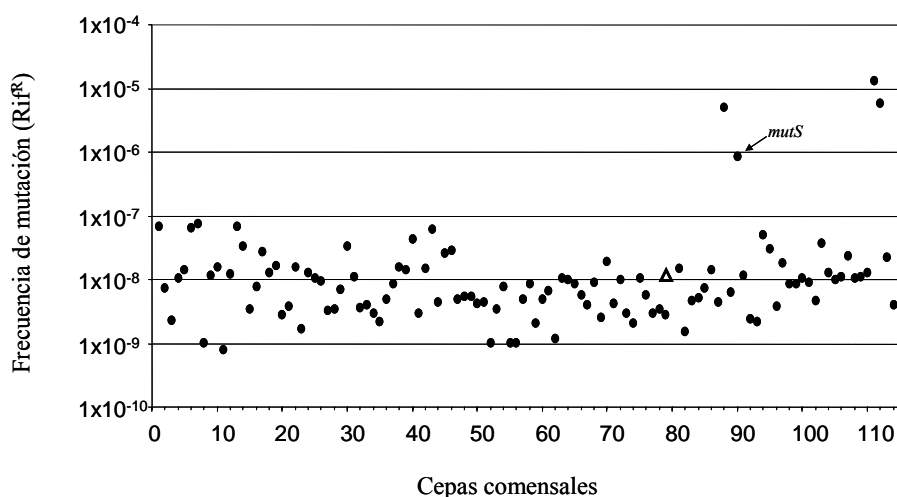


Fig. 6: Frecuencia de mutación (Rif^R) de las cepas comensales de *E.coli*. Cada punto representa la frecuencia de mutación de una cepa. La frecuencia de mutación de la cepa control *E.coli* K-12 MG1655 se representa como un triángulo. La flecha indica el genotipo mutador conocido (Picard *et al.*, 2001).

4.3. ESTUDIO DE LA FRECUENCIA DE RECOMBINACIÓN EN CEPAS COMENSALES DE *E.coli*.

Para estudiar recombinación en la colección de cepas comensales de *E.coli* se llevaron a cabo experimentos de conjugación en los que una bacteria donadora (F⁺) transfiere DNA (DNA plasmídico si se trata de una bacteria donadora F' o DNA cromosómico si se trata de una bacteria donadora Hfr) a una bacteria receptora (F⁻). El cruce de diferentes cepas

donadoras, con cada una de las cepas de la colección, permite medir las frecuencias de conjugación y recombinación de las cepas receptoras. Los distintos tipos de cruces realizados se resumen en la **tabla 4**.

Tabla 4. Tipos de cruces realizados para determinar las frecuencias de conjugación y recombinación de la colección de cepas naturales de *E.coli*.

CRUCE (F^+ x F^-)	DNA que se transfiere	Información que aporta
<i>E.coli</i> MG1655 Rif ^R F' <i>Tn10</i> x <i>E.coli</i> natural Nal ^R	DNA plasmídico (plásmido F con transposón <i>Tn10</i> , que confiere resistencia a tetraciclina).	Frecuencia de conjugación
<i>E.coli</i> Hfr Ele-1 x <i>E.coli</i> natural Nal ^R	DNA cromosómico (gen de resistencia a kanamicina) situado en el lugar del gen <i>fhuD</i> de la cepa donadora <i>E.coli</i> Hfr. La bacteria receptora sólo adquiere resistencia a Kan si incorpora el DNA a su cromosoma mediante recombinación.	Frecuencia de recombinación homóloga
<i>S.typhimurium</i> SA965 Hfr <i>hemL::MudJ</i> x <i>E.coli</i> natural Nal ^R	DNA cromosómico (fago MudJ con gen de resistencia a kanamicina insertado en el gen <i>hemL</i> de la cepa donadora <i>S.typhimurium</i> Hfr. La bacteria receptora sólo adquiere resistencia a Kan si incorpora el DNA a su cromosoma mediante recombinación.	Frecuencia de recombinación homeóloga (secuencias divergentes)

Para poder contraseleccionar los donadores en estos experimentos era necesario que las cepas receptoras fuesen resistentes a algún antibiótico al que las cepas donadoras fuesen sensibles. Para ello se generaron mutantes espontáneos resistentes a ácido nalidíxico de cada una de las cepas de la colección. Por lo tanto, las cepas receptoras de estos experimentos fueron dichos mutantes. Para poder medir la transferencia o recombinación de DNA se usaron genes de resistencia a antibiótico (tetraciclina y kanamicina) como marcadores. Se excluyeron de este estudio las cepas de la colección que presentaron resistencia natural a alguno de estos dos antibióticos. De las 113 cepas comensales, 11 (10,6%) presentaban resistencia natural a

tetraciclina (20µg/ml) y ninguna a kanamicina (50µg/ml), por lo tanto se estudió la recombinación de un total de 102 cepas.

4.3.1. Frecuencias de recombinación de las cepas comensales de *E.coli*.

Se hizo un escrutinio previo de las cepas comensales, en el que se realizaron los tres tipos de cruces que se describen en la **tabla 4**. De las 102 cepas analizadas, en 23 (22,5%) no se obtuvo ninguna colonia en ninguno de los tres cruces (frecuencias $\leq 1 \times 10^{-10}$). El resto (79 cepas) fueron analizadas por triplicado.

En la **figura 7** se representan las frecuencias de recombinación homóloga y homeóloga (secuencias divergentes) de las 79 cepas comensales estudiadas y del control MG1655. Como puede observarse el 100% de las cepas analizadas presentan una frecuencia de recombinación homóloga por debajo de la de la cepa de laboratorio *E.coli* K-12 MG1655 ($1,5 \times 10^{-3}$). De hecho, de las 79 cepas, 67 (84,8%) presentan una frecuencia de recombinación homóloga al menos 1000 veces por debajo de la de MG1655. Sin embargo, las diferencias entre las frecuencias de recombinación homeóloga o de secuencias divergentes de las cepas comensales con la cepa de laboratorio son mucho menores. La frecuencia de recombinación homeóloga del 21,5% de las cepas comensales está 10 veces por encima de la de MG1655 ($4,8 \times 10^{-8}$), y la del 34,1% está 10 veces por debajo. En la **figura 7** se señala la frecuencia de recombinación homeóloga de los cuatro hipermutadores de la colección de cepas comensales. Entre ellos está el mutante caracterizado como *mutS*. Como era de esperar por su deficiencia en el sistema MMR, esta cepa no presenta una frecuencia de recombinación de secuencias divergentes muy distinta a la de secuencias homólogas. Esta característica es común a los otros tres hipermutadores de genotipo no identificado, lo que sugiere que deben ser defectivos en el sistema MMR.

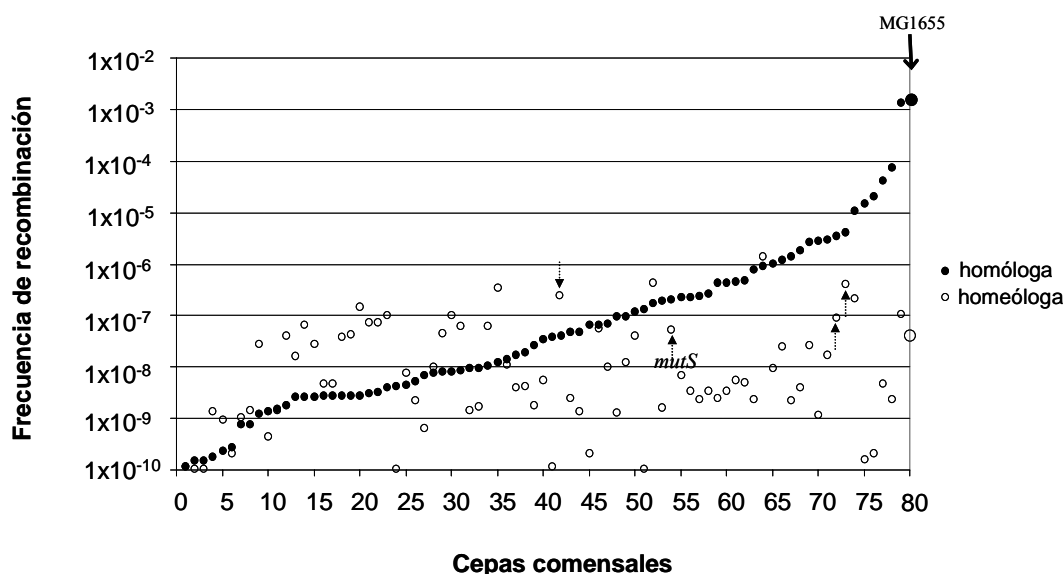


Fig. 7: Frecuencias de recombinación de las cepas comensales de *E.coli*. Los círculos rellenos representan las frecuencias de recombinación homóloga (donador *E.coli* Hfr) ordenadas de menor a mayor y los círculos vacíos representan las frecuencias de recombinación homeóloga o de secuencias divergentes (donador *S.typhimurium* Hfr) conservando el orden establecido para la recombinación homóloga. Las flechas señalan los mutadores y la flecha más gruesa señala la cepa de laboratorio MG1655, cuyas frecuencias de recombinación homóloga y homeóloga están representadas por puntos de mayor tamaño.

Para poder obtener un valor teórico de la recombinación en nuestros ensayos, las frecuencias de recombinación homóloga y homeóloga de cada cepa se normalizaron con sus respectivas frecuencias de conjugación (obtenidas del cruce con *E.coli* F'Tn10). De esta manera se estimó qué fracción del DNA que entra en la bacteria es capaz de integrarse por recombinación. A este dato lo denominamos porcentaje de recombinación teórico ya que es una estimación meramente orientativa. Aunque se observó que la mayoría de las cepas naturales tenían más dificultades que la estirpe MG1655 para captar y/o establecer el DNA plasmídico (todas las frecuencias de conjugación de las cepas comensales están por debajo de la de MG1655), la capacidad teórica de estas cepas para incorporar a su cromosoma el DNA que consigue entrar en la bacteria, es mucho mayor que la de la cepa de laboratorio. De las 79 cepas analizadas, 67 (84,8%) presentan un porcentaje teórico de recombinación homóloga por encima de la cepa de laboratorio (% recombinación homóloga MG1655 = 0,24%) y 78 (98,7%) presentan un porcentaje teórico de recombinación homeóloga por encima de la cepa de laboratorio (% recombinación homeóloga MG1655 = 0,000008%) (**figura 8**). Además, 15 cepas (18,9%) y 19 cepas (24%) presentan un porcentaje teórico de recombinación homóloga

y homeóloga, respectivamente, por encima del 100%, lo que sugiere que estas cepas tienen problemas para replicar el plásmido F'.

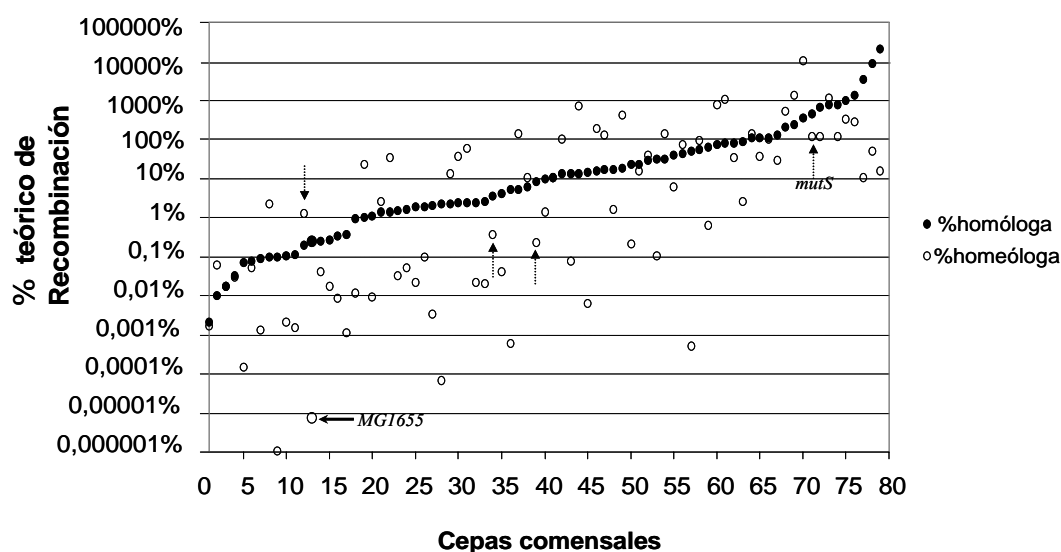


Fig. 8: Porcentajes teóricos de recombinación homóloga y homeóloga de las cepas comensales. Los datos de % teórico de recombinación homóloga están ordenados de menor a mayor y los de % teórico de homeóloga están representados conservando el orden establecido para los anteriores. Las flechas verticales señalan los mutadores y la flecha horizontal señala la cepa de laboratorio MG1655, cuyos porcentajes teóricos de recombinación homóloga y homeóloga están representados por círculos de mayor tamaño

El **índice de recombinación diferencial (IRD)** (figura 9), definido como la relación entre las frecuencias de recombinación homeóloga y homóloga, nos informa de cómo de restrictivos son los sistemas que impiden la recombinación de secuencias divergentes de la bacteria. Este índice es de $3,2 \times 10^{-5}$ para MG1655. Encontramos que de las 79 cepas comensales, 76 (96,2%) mostraban un índice de recombinación diferencial mayor que la cepa K-12 indicando que, aparentemente, estas cepas son menos restrictivas para llevar a cabo la recombinación entre secuencias divergentes. Además, 28 cepas presentaban una relación homeóloga/homóloga igual o mayor de 1 (figura 9), lo que indica que el 35,4% de las cepas comensales analizadas no presentaban mayores restricciones para la recombinación de secuencias divergentes que para la de secuencias homólogas. Para demostrar que estas cepas con un $IRD > 1$ eran en realidad *E.coli* se secuenció una región de la subunidad ribosomal 16S. La secuencia obtenida se analizó mediante el programa informático *green genes* (ver material y métodos, apartado 3.4.5). Este análisis confirmó que todas las cepas eran *E.coli*.

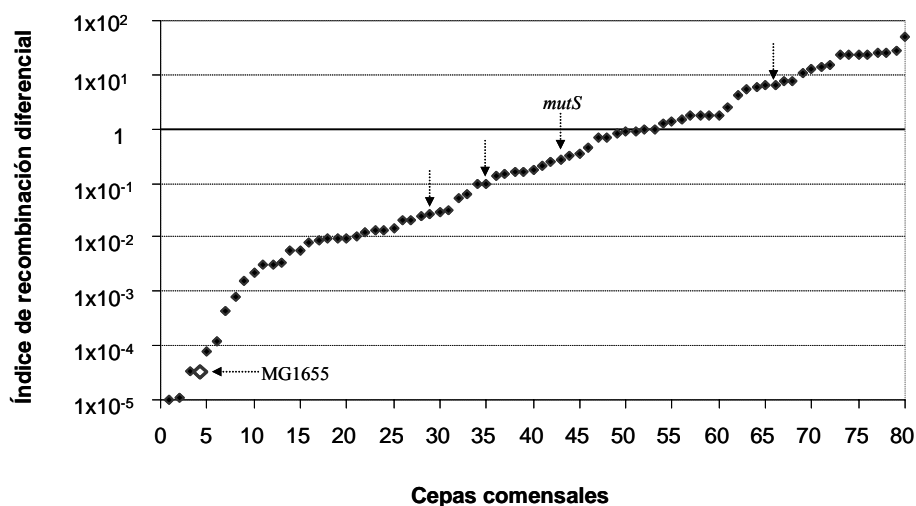


Fig. 9: Índice de recombinación diferencial (IRD) de las cepas comensales. Cada uno de los rombos representa el índice recombinación diferencial de una cepa. Las flechas verticales indican el IRD de los 4 hipermutadores de la colección de cepas comensales y la flecha horizontal el IRD de la cepa MG1655. Los datos representados están ordenados de IRD menor a mayor.

4.3.2. Análisis de las regiones diana.

La divergencia genómica entre *E.coli* K-12 y *S.typhimurium* es aproximadamente del 16% (Matic *et al.*, 1995), pero no sabemos si éste es también el porcentaje de divergencia genómica entre las cepas comensales de *E.coli* y nuestra estirpe de *S.typhimurium*. El conocimiento de la homología de secuencia en todas las cepas requeriría de una gran inversión de tiempo y presupuesto. Esto está, obviamente, fuera de las posibilidades de un proyecto de tesis como el presente. Para tener una idea sobre la homología o divergencia de secuencia existente en las regiones diana en las que medimos las frecuencias de recombinación homóloga y divergente, se amplificaron por PCR y se secuenciaron los genes *fhuD* y *hemL* de algunas cepas que se consideraron interesantes por su capacidad de recombinación. Con el objetivo de conocer los porcentajes de homología en las regiones de recombinación se analizaron las secuencias de muchas de las cepas que presentaban una frecuencia de recombinación homeóloga similar o superior a la homóloga. Los porcentajes de homología de estas cepas se muestran, junto con las frecuencias de recombinación homóloga y divergente, en la **tabla 5**. Las secuencias se compararon mediante el programa informático de alineamiento de secuencias BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con las secuencias obtenidas para nuestra cepa de *E.coli* K-12 y con las publicadas de los genes *fhuD* y *hemL* para *E.coli* K-12 MG1655 y *Salmonella* (*Salmonella enterica* subsp. serovar Typhimurium). Se comprobó que los porcentajes de homología del gen *hemL* de las cepas

comensales y nuestra MG1655 con la secuencia del gen *hemL* publicada de *Salmonella*, eran de entre el 87 y 89% (divergencia entre el 11 y 13 %). Al comparar las secuencias del gen *fhuD* de las cepas comensales con el gen *fhuD* de nuestra *E.coli* K-12 MG1655, observamos que la mayoría de ellas no presentaba una homología del 100%, sino de entre el 96 y el 98%. Aun así, en este análisis hay que tener en cuenta que, ya que la recombinación puede ocurrir en puntos muy alejados de dichas secuencias, la información que proporciona la secuencia de los genes *hemL* y *fhuD* no es más que orientativa.

Tabla 5: Frecuencias de recombinación homóloga y homeóloga y porcentajes de homología de las secuencias obtenidas de los genes *fhuD* y *hemL* de cada una de las cepas, con las secuencias publicadas de dichos genes para las cepas *E.coli* MG1655 y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, respectivamente.

Cepa*	Frecuencia de recombinación Homóloga	Frecuencia de recombinación Homeóloga	% homología <i>fhuD</i>	% homología <i>hemL</i>
MG1655	1,50E-03	4,9E-08	100%	88,5%
P4X	-	-	100%	-
C13	3,27E-09	7,33E-08	98%	87%
C15	2,66E-06	2,63E-08	97%	86%
C34	1,08E-05	2,14E-07	100%	88,5%
C47	1,74E-07	4,3E-07	96%	89%
C53	1,85E-09	4,1E-08	99,5%	88,5%
C59	7,04E-08	1,03E-08	96%	88%
C69	9,19E-07	1,4E-06	96%	87,5%
C70	6,57E-08	5,8E-08	98%	87%
C71	4,11E-09	1,0E-07	96,5%	87%
C72	8,21E-09	1,0E-07	98%	87%
C73	2,85E-09	1,5E-07	96%	87%
C74	8,55E-09	6,3E-08	96%	89%
C80	1,07E-08	6,4E-08	98%	86,5%
C81	1,23E-08	3,4E-07	100%	89%
M9	3,57E-06	9,32E-08	99%	87%
M11	2,03E-07	5,33E-08	98%	86,5%
M33	4,14E-08	2,62E-07	96,5%	86,5%
M34	4,23E-06	4,18E-07	96%	87%
M36	1,34E-08	1,28E-08	95%	87%

*El nombre de las cepas corresponde al asignado en este estudio. Las cepas con la inicial C corresponden a la colección “Croacia” y las cepas con la inicial M corresponden a la colección “Mali”

4.4. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES DEL SISTEMA SOS EN CEPAS COMENSALES DE *E.coli*.

Para evaluar si existe relación entre la expresión de los genes *dinB* y *recA* y las frecuencias de mutación y recombinación de las cepas naturales de *E.coli* se estudiaron, de forma indirecta, los niveles de expresión basales de ambos genes. En principio, una mayor expresión basal de *recA* podría traducirse en una frecuencia de recombinación más alta (Matic *et al.*, 1995). Igualmente, una mayor expresión de *dinB* produciría una tasa de mutación más alta (Sutton *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001).

Se estudiaron, por lo tanto, los niveles basales de transcripción de estos genes en las cepas comensales “Croacia” a través de la medida de los niveles de expresión de sendas fusiones transcripcionales *recA::gfp* y *dinB::gfp*. Como complemento a este estudio también se estudiaron los niveles de expresión tras la inducción del sistema SOS. Como control de un gen cuya regulación no depende de la respuesta SOS, se incluyó en el estudio el gen *lacZ*, que codifica para la β -galactosidasa y pertenece al operón Lac (ver material y métodos, apartado 3.7.1).

En la **figura 10** se muestra la media de los niveles de transcripción absolutos, basales e inducidos, de los genes *recA* y *dinB* en las 79 cepas comensales “Croacia” que se estudiaron. Como se observa en la figura, hay pocas variaciones entre los niveles de transcripción basales de ambos genes a las 4 y 24 horas, aunque en ambos casos los niveles promedio de *dinB* son algo inferiores a los de *recA*. También se observó que tanto a las 4 como a las 24 horas los niveles basales de transcripción de ambos genes eran muy homogéneos entre las cepas (ninguna destacó por presentar un nivel basal muy distinto a la media).

El tratamiento con ciprofloxacino (Cip) 0,12 μ g/ml provocó la inducción del sistema SOS en todas las cepas, tanto a las 4 horas como a las 24 horas. En promedio, la inducción de la transcripción de *recA* mediada por Cip fue mayor que la de *dinB* a ambos tiempos, y para los dos genes la media de los niveles de inducción son algo superiores a las 4 horas (**figura 10**). Como era de esperar, el tratamiento con Cip no indujo la expresión de *lacZ* (control de expresión de un gen externo al SOS), por lo que podemos descartar que la inducción observada para *dinB* y *recA* sea debida a artefactos experimentales como el aumento en el número de copias del plásmido. Para controlar la inducción de este gen se utilizó IPTG 1mM, un análogo no hidrolizable de la lactosa que induce la expresión de genes del operón Lac. Se observó que el gen *lacZ* se induce con IPTG, tanto a las 4 como a las 24 horas (**tabla 6**).

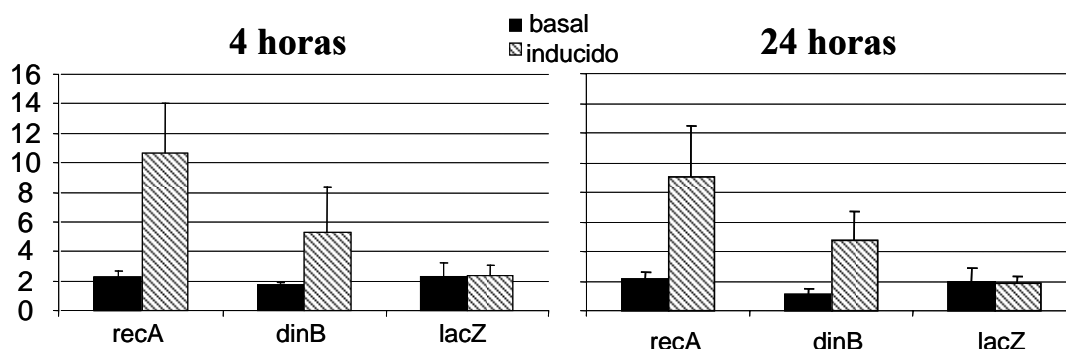


Fig. 10: Niveles de transcripción absolutos de *recA*, *dinB* y *lacZ*, basales e inducidos (con Cip 0,12μg/ml), de las cepas comensales “Croacia” medidos con los plásmidos pSC101-*PrecA*::GFP, pSC101-*PdinB*::GFP y pSC101-*PlacZ*::GFP respectivamente, a las 4 y 24 horas. El nivel de transcripción absoluto es el resultado de la medida de fluorescencia, relativa a la DO, de cada cepa portadora del plásmido correspondiente, y normalizado con el mismo valor obtenido con el plásmido control sin promotor, pSC101-*Pless*::GFP.

Para estudiar cuántas veces se incrementa la transcripción de los genes de *recA* y *dinB*, se normalizo el nivel de expresión inducido absoluto con el nivel de expresión basal, obteniéndose la inducción relativa para cada cepa (**tabla 6**). A las 4 horas, el promedio de la inducción relativa de *recA* es mayor que el de *dinB*, mientras que a las 24 horas es muy parecido en ambos genes.

Tabla 6: Inducción relativa promedio de la transcripción (\pm SD) de *recA*, *dinB* y *lacZ* a las 4 y 24 horas, resultado del tratamiento con ciprofloxacino 0,12μg/ml.

	<i>recA</i>	<i>dinB</i>	<i>lacZ</i>	<i>lacZ</i> (inducción con IPTG)
4 horas	4,83 \pm 1,68	3,04 \pm 1,71	1,08 \pm 0,22	3,20 \pm 1,39
24 horas	4,52 \pm 1,92	4,63 \pm 1,83	1,10 \pm 0,40	4,12 \pm 3,06

Para estudiar las diferencias en los niveles de expresión basales e inducidos de *recA* y *dinB* en las cepas comensales con respecto a la cepa de laboratorio, se normalizaron todos los datos con los obtenidos para el control MG1655. Tanto a las 4 como a las 24 horas los niveles de transcripción basales de ambos genes en las cepas naturales, no sólo son muy homogéneos entre ellos sino que además son muy similares a los de la cepa de laboratorio (**figura 11a**). Sin embargo, los niveles inducidos de *recA* y *dinB* son más heterogéneos entre ellos y presentan además mayores variaciones con respecto a MG1655 (**figura 11b**). Destaca que estas diferencias son más patentes para *recA*, donde los niveles de inducción de este gen están en promedio por debajo de los de MG1655 a ambos tiempos (el 96,1% y 88,6% de las cepas

presentan unos niveles inducidos de *recA* inferiores al de MG1655, a las 4 y 24 horas, respectivamente). Estos datos indican que, aunque los niveles de transcripción basales de estos dos genes del SOS son similares en la cepa de laboratorio y en las cepas naturales, sí que existen diferencias en cómo afecta la inducción del SOS a distintos genes que forman parte del regulón.

Para descartar que las diferencias en la inducción de los genes *recA* y *dinB*, entre unas cepas y otras, y entre la cepa de laboratorio, pudieran ser debidas distintas sensibilidades al antibiótico utilizado para inducir el SOS, se comprobó que todas las cepas analizadas, incluida la cepa de laboratorio, presentaban la misma CMI de Ciprofloxacino (0,12 µg/ml).

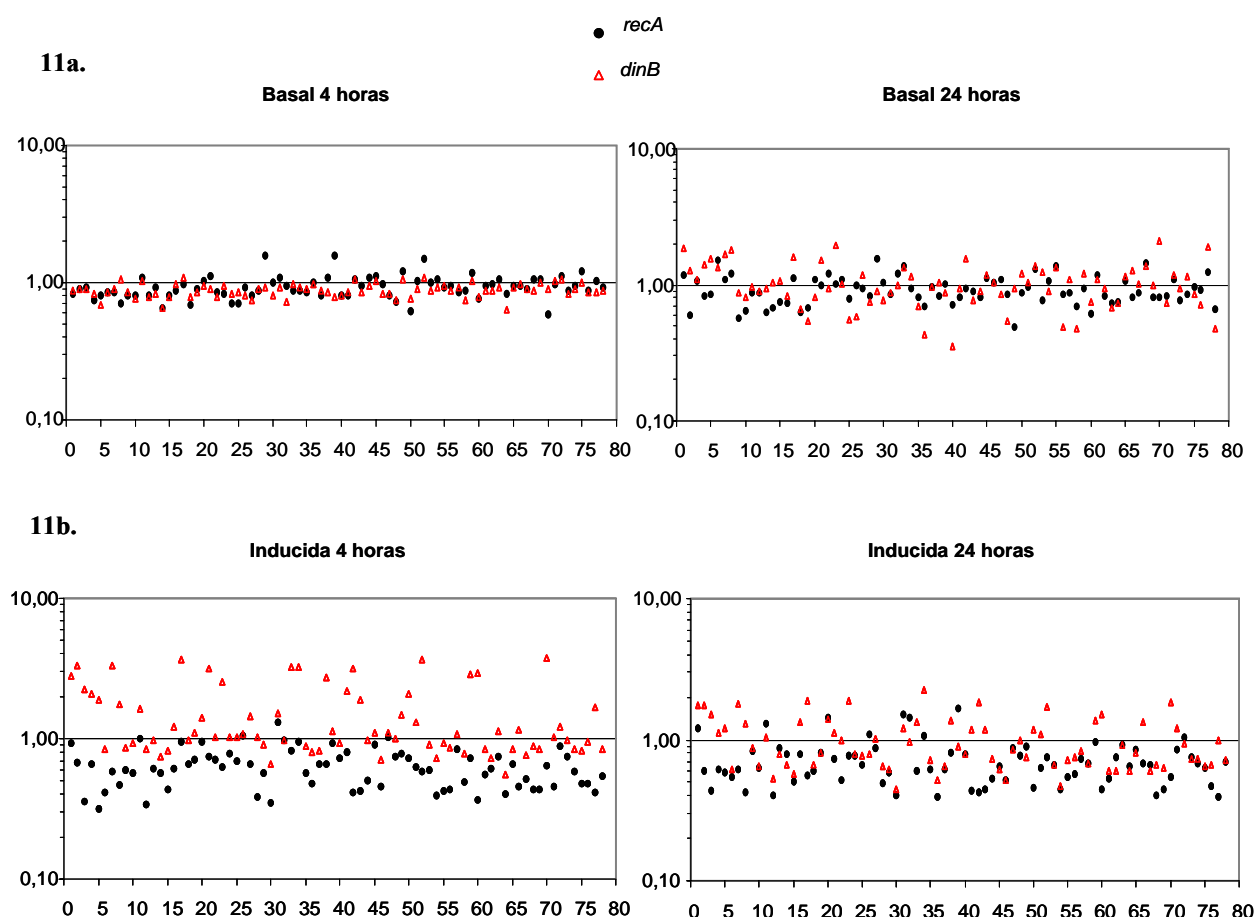


Fig. 11: Niveles de la transcripción basales (a) e inducidos (b) de *recA* (círculos negros) y *dinB* (triángulos rojos) en las cepas comensales, a las 4 y 24 horas. Los valores por encima y por debajo de la línea representan los niveles de transcripción normalizados con respecto a los valores de la transcripción de *recA* y *dinB* en MG1655 (valor 1).

4.5. RELACIÓN ENTRE MUTACIÓN, RECOMBINACIÓN Y TRANSCRIPCIÓN DE *recA* Y *dinB* EN CEPAS COMENSALES DE *E.coli*.

La mutación y la recombinación son dos propiedades que pueden estar muy ligadas en la bacteria. Por ejemplo, los mutantes MMR⁻, uno de los hipermutadores más habituales en la naturaleza, además de ser hipermutadores presentan un fenotipo hiperrecombinador de secuencias divergentes (Rayssiguier *et al.*, 1989). Se estudió, por lo tanto, si existía relación entre las frecuencias de mutación y el índice de recombinación diferencial (IRD) de las cepas naturales de *E.coli*. Efectivamente las cepas mutadoras presentaban alto IRD, pero muchas cepas con alto IRD no eran mutadoras. No se encontró correlación estadísticamente significativa ($P < 0,05$) entre la frecuencia de mutación y el IRD.

Por otro lado, los niveles de transcripción de RecA pueden influir en la recombinación de secuencias homólogas y divergentes (Matic *et al.*, 1995). Sin embargo, tampoco se encontró correlación entre los niveles basales de transcripción de *recA* y la frecuencia de recombinación (homóloga y homeóloga) ($P < 0,05$).

Además, dado que el gen *dinB* codifica la DNA polimerasa mutagénica Pol-IV, se estudió la posible relación entre los niveles de expresión basal de *dinB* y las frecuencias de mutación. Nuestros resultados sugieren que no existe una correlación, estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre la expresión de *dinB* y las frecuencias de mutación (obviamente, tampoco de recombinación). Por lo tanto, parece que las diferencias en las frecuencias de mutación observadas en las cepas comensales no son debidas a una transcripción diferencial de *dinB*.

4.6. ESTUDIO DE MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN EN CEPAS PATÓGENAS DE *E.coli*.

Tras realizar el estudio de mutación y recombinación en la colección de cepas comensales de *E.coli*, nos preguntamos si las cepas patógenas, teóricamente sometidas a un mayor estrés (defensas del huésped y tratamientos con antibióticos), presentaban diferencias en las frecuencias de mutación y recombinación con respecto a las comensales, por lo que se decidió repetir el mismo estudio con una colección de cepas patógenas de *E.coli*. Esta colección, amablemente cedida por el Dr. Denamur, consta de 111 estirpes que fueron aisladas de seres humanos que presentaban diversas patologías, como infecciones del tracto urinario, septicemia o infecciones pulmonares (Picard *et al.*, 1999; Denamur *et al.*, 2002).

Tanto para el estudio de mutación como para el de recombinación en las cepas patógenas, se usaron los mismos métodos y protocolos que en las cepas comensales.

4.6.1. Frecuencias de mutación de las cepas patógenas de *E.coli*.

De los 111 aislados de cepas patógenas de *E.coli*, 100 (90%) presentaban fenotipo normomutador y 11 (9,9%) presentaban fenotipo mutador. De los mutadores, 3 eran hipermutadores. De los 11 mutadores encontrados conocemos la base molecular de la mutación de 5 de ellos, todos deficientes en algún gen del sistema MMR (Picard *et al.*, 2001). Dos de los hipermutadores fueron identificados como *mutS* y del tercer hipermutador no se determinó el genotipo. El resto de mutadores con genotipo conocido se muestran señalados en la **figura 12**. La proporción de mutadores fue mayor en la colección de cepas patógenas que en la de cepas comensales. No se encontraron, sin embargo, hipomutadores en la colección de cepas patógenas, aunque 3 cepas presentaron una frecuencia de cerca de 10 veces menor que la media de las normomutadoras. La frecuencia de mutación media de las cepas normomutadoras fue de $1,46 \times 10^{-8}$ y la de las cepas mutadoras fue de $2,18 \times 10^{-6}$. Las frecuencias de mutación de las cepas patógenas se encuentran reflejadas en la **figura 12**.

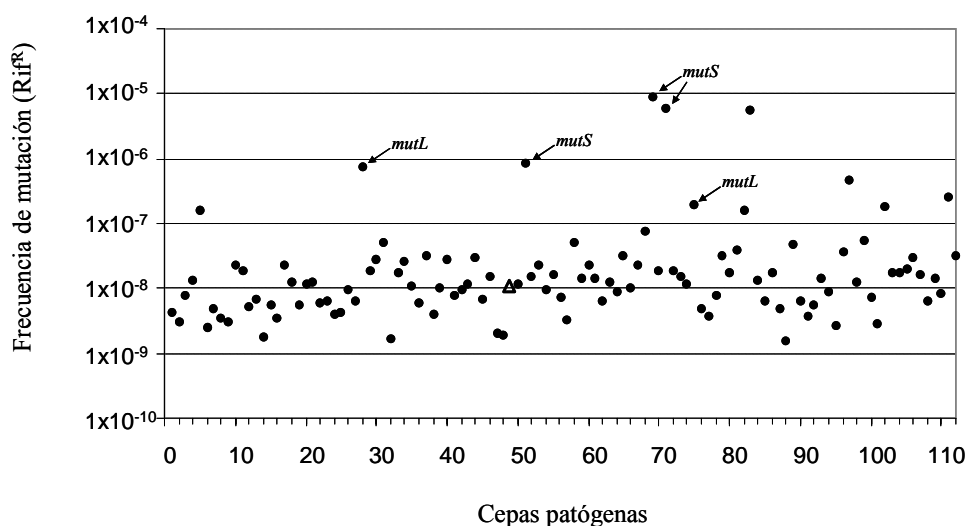


Fig. 12: Frecuencia de mutación (Rif^R) de las cepas patógenas de *E.coli*. Cada uno de los puntos representa la frecuencia de mutación de una cepa. La frecuencia de mutación de la cepa control *E.coli* K-12 MG1655, se representa como un triángulo. Las flechas indican los mutadores con genotipo identificado (Picard *et al.*, 2001).

4.6.2. Frecuencias de recombinación de las cepas patógenas de *E.coli*.

Al igual que para las cepas comensales, antes de comenzar el estudio de recombinación, se descartaron las estirpes resistentes a alguno de los antibióticos utilizados para seleccionar recombinantes. De las 111 cepas patógenas, 18 (13,2%) eran resistentes naturales a tetraciclina (20µg/ml) y 2 a kanamicina (50µg/ml). Por lo tanto se estudió la recombinación de un total de 91 cepas de la colección de patógenas.

Para las cepas patógenas también se hizo un escrutinio previo en el que se realizaron los tres tipos de cruces descritos en la **tabla 4**. De las 91 cepas analizadas, en 16 (17,5% de las cepas) no se obtuvo ninguna colonia en ninguno de los tres cruces (frecuencias $\leq 1 \times 10^{-10}$). El resto (75 cepas) fueron analizadas por triplicado.

En la **figura 13** se representan las frecuencias de recombinación homóloga y homeóloga (secuencias divergentes) de las 75 cepas patógenas y del control MG1655. Al igual que en el caso de las cepas comensales, el 100% de las cepas patógenas analizadas presentan una frecuencia de recombinación homóloga por debajo de la de la cepa de laboratorio (el 82,6% de las cepas presentan una frecuencia de recombinación homóloga al menos 1000 veces por debajo de las de MG1655). Las frecuencias de recombinación homeóloga se encuentran mayoritariamente (76% de las cepas) en el intervalo entre 1×10^{-8} y 1×10^{-9} . Las frecuencias de recombinación de secuencias divergentes están, en su mayoría, también por debajo de la de MG1655, aunque destacan 4 cepas que presentan una frecuencia por encima de la de la cepa de laboratorio (**figura 13**). Una de esas 4 cepas está genotipada (Picard *et al.*, 2001) y es deficiente en el sistema MMR (*mutL*). Se observó que el resto de cepas de la colección que han sido también caracterizadas como MMR⁻ y forman parte de este estudio, no presentaban una frecuencia de recombinación homeóloga distinta a la media, pero sí tenían, como es de esperar, un IRD considerablemente mayor que el del control MG1655.

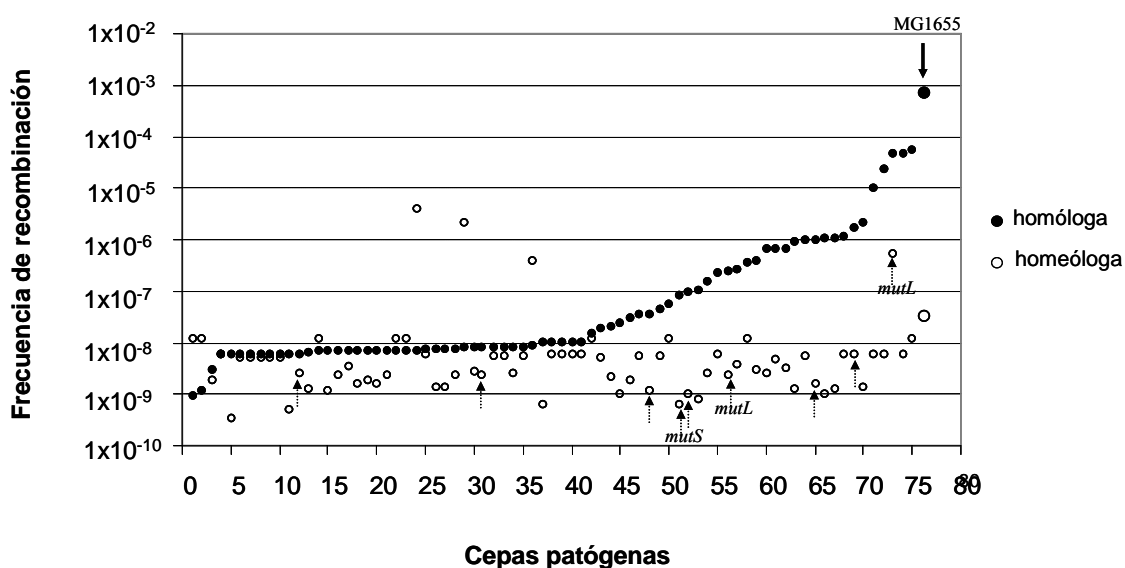


Fig. 13: Frecuencias de recombinación de las cepas patógenas de *E. coli*. Los círculos rellenos representan las frecuencias de recombinación homóloga (donador *E. coli* Hfr) ordenadas de menor a mayor y los círculos vacíos representan las frecuencias de recombinación homeóloga o de secuencias divergentes (donador *S. typhimurium* Hfr), conservando el orden establecido para la recombinación homóloga. Las flechas señalan los mutadores y la flecha más gruesa señala la cepa de laboratorio MG1655, cuyas frecuencias de recombinación homóloga y homeóloga están representadas por puntos de mayor tamaño.

4.7. DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE RECOMBINACIÓN EN CEPAS NATURALES DE *E. coli*.

En la **figura 14** se comparan las frecuencias de recombinación de las cepas comensales con las de las patógenas. Las frecuencias de recombinación homóloga obtenidas en las dos colecciones de cepas son similares (**figura 14a**). Sin embargo, hay más diferencias en la distribución de las frecuencias de recombinación homeóloga, donde además la frecuencia de recombinación homeóloga promedio es mayor en las comensales (**14b**). Como se observa en la **figura 14c**, hay pocas diferencias entre los índices de recombinación diferencial que presentan las cepas comensales y las patógenas, aunque hay un porcentaje mayor de cepas comensales con un IRD igual o superior a 1 (aquellas cepas que recombinan igual o mejor las secuencias divergentes que las homólogas).

En cuanto a la capacidad de adquirir DNA se observó que las cepas patógenas presentaban en su mayoría unas frecuencias de conjugación inferiores a las de las cepas comensales, lo que muestra que las cepas patógenas tienen muy disminuida su capacidad de captar y/o establecer el DNA del plásmido F' utilizado en nuestro ensayo.

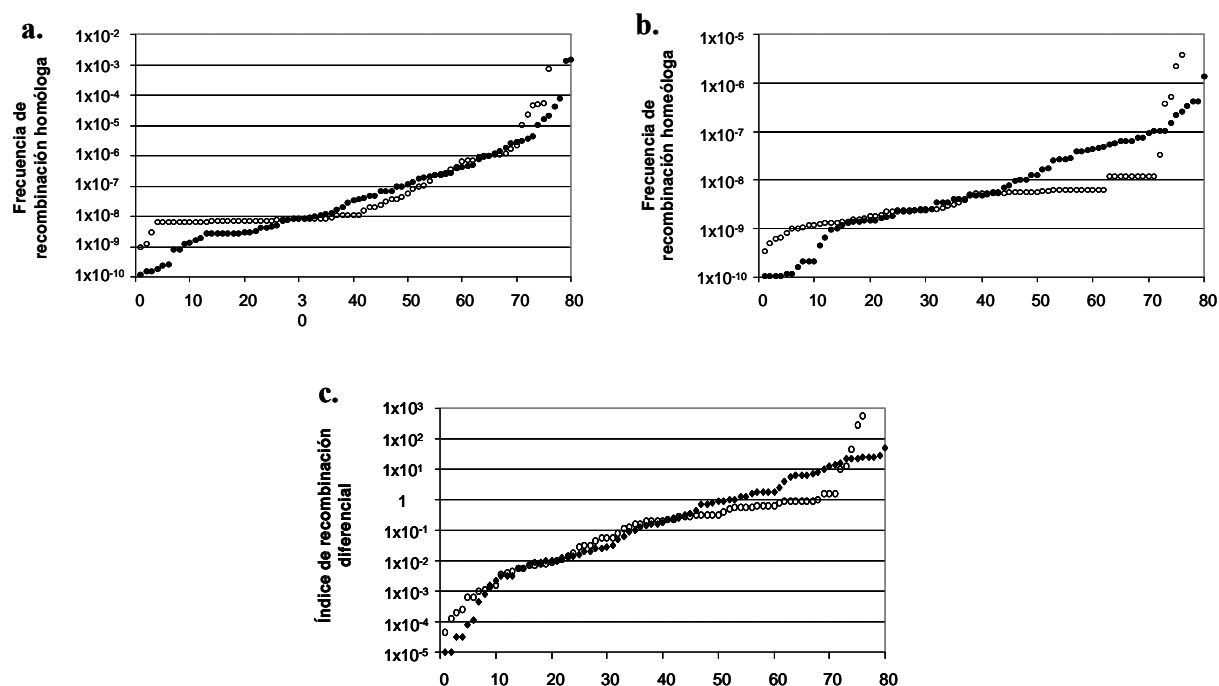


Fig. 14: Comparación de las frecuencias de recombinación homóloga (a) y homeóloga (b) y del índice de recombinación diferencial (IRD) (c), de las cepas comensales con las de las cepas patógenas. Los círculos rellenos representan las cepas comensales y los círculos vacíos las patógenas. En el eje horizontal se representan las cepas ordenadas. Todos los parámetros representados están ordenados de menor a mayor independientemente en cada gráfico.

4.8. DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE MUTACIÓN EN CEPAS NATURALES DE *E.coli*.

Una vez obtenidos los datos de mutación de las dos colecciones de cepas naturales de *E.coli* (113 comensales + 111 patógenas), se analizaron conjuntamente para estudiar la distribución de las frecuencias de mutación.

De las 224 estirpes, 204 (91%) presentaban fenotipo normomutador. Se encontraron en la colección un total de 15 cepas (6,69%) mutadoras (frecuencia de mutación al menos 10 veces superior a la de MG1655) y de esas mutadoras, 6 presentaban fenotipo hipermutador (frecuencia de mutación más de 100 veces superior a la de MG1655), por lo que los hipermutadores representaban un 2,67% del total de la población. Además se encontraron 5 hipomutadores (frecuencia de mutación al menos 10 veces por debajo de la de MG1655), que representaban el 2,23% de la población.

En la figura 15 se representan las distribuciones de las frecuencias de mutación de las cepas comensales y patógenas (**figura 15a**) y los porcentajes ambos tipos de cepas que

presentan cada uno de los 4 fenotipos mutadores descritos en este trabajo: hipomutador, normomutador, mutador e hipermutador (**figura 15b**). La cantidad de mutadores encontrados en cepas patógenas es superior al de comensales, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas (Mann-Whitney: $p=0,4$). El número de hipermutadores fue el mismo en ambos tipos de cepas.

No se encontraron hipomutadores en la población de cepas patógenas, aunque si cepas con una frecuencia de mutación muy cercana a la definida como hipomutadora ($<1 \times 10^{-9}$). Por otro lado, un 4,4% de las cepas comensales presentaban fenotipo hipomutador. Estas diferencias en la cantidad de hipomutadores en ambos tipos de cepas no son sin embargo estadísticamente significativas (Mann-Whitney: $p=0,5$).

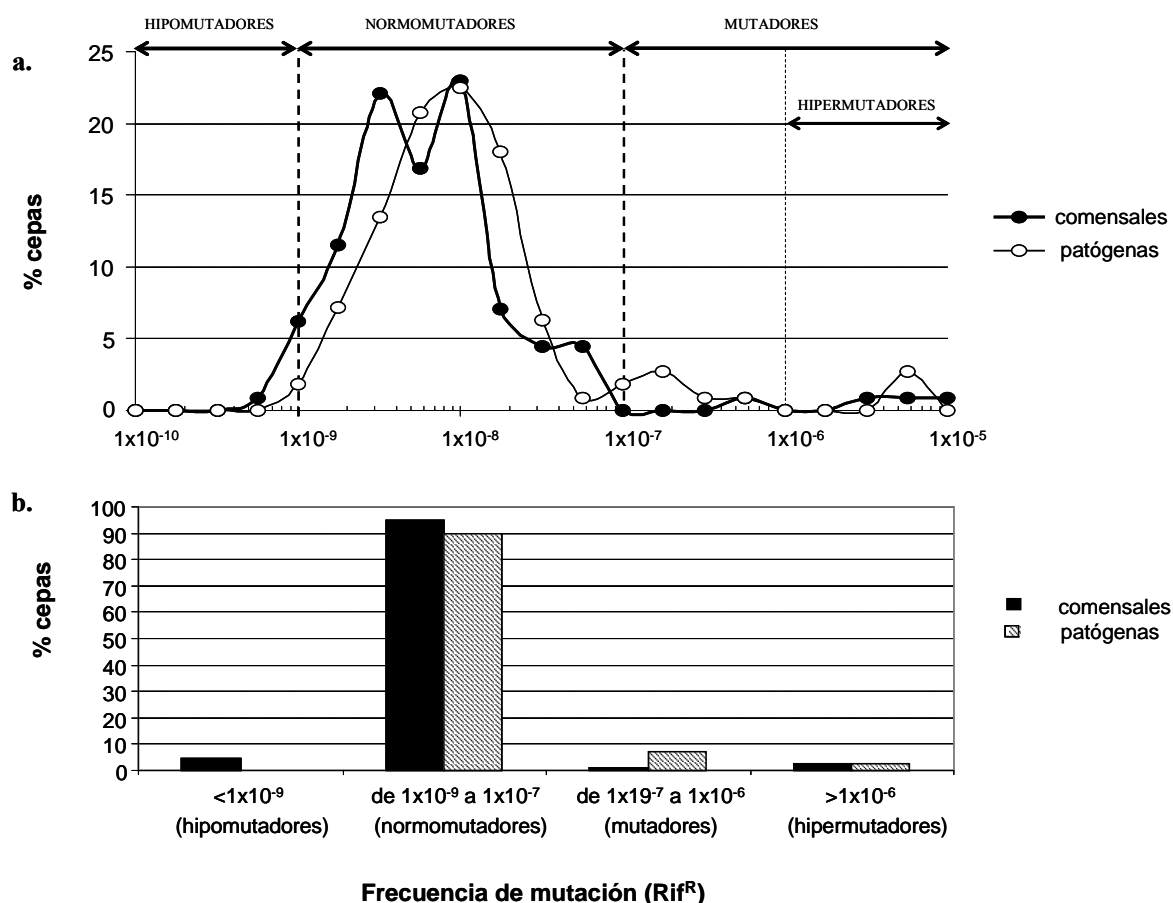


Fig 15: (a) Distribución de las frecuencias de mutación a rifampicina de las cepas comensales y patógenas de *E.coli*. En el eje horizontal se representan las frecuencias de mutación, en escala logarítmica (log₁₀) y divididas en 20 intervalos homogéneos. (b) Porcentajes de cepas comensales y patógenas que presentan cada uno de los 4 fenotipos mutadores descritos en este trabajo: hipomutador, normomutador, mutador e hipermutador.

Capítulo 2

Antibióticos y Recombinación

Capítulo 2: Antibióticos y Recombinación

Una inducción de la respuesta SOS se traduce en una sobreproducción de RecA, la principal proteína implicada en el proceso de recombinación homóloga (Matic *et al.*, 1995). Basándonos en esto, se decidió estudiar si el tratamiento con antibióticos inductores del sistema SOS, se veía reflejado en un incremento en las frecuencias recombinación de las bacterias tratadas. Se utilizaron los antibióticos ciprofloxacino (Cip) y ceftazidima (Caz), previamente descritos como inductores del sistema SOS (Ysern *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 2004; Perez-Capilla *et al.*, 2005). Los tratamientos se hicieron en todos los casos con concentraciones subinhibidoras de los mismos. Para cada una de las cepas estudiadas se calcularon las CMI de los antibióticos en las mismas condiciones en las que se llevaron a cabo los experimentos (**tabla 7**). Como se observa en la tabla, las CMI de Cip para los mutantes *recA*, *lexA*, *recB* y doble mutante *recBrecF*, están 10 veces por debajo de la de la cepa salvaje, mientras que para Caz no se ven estas variaciones. Cip daña la bacteria a nivel de DNA mientras que Caz lo hace a nivel de pared celular. Esto explica porqué éstos mutantes, que no pueden llevar a cabo la respuesta SOS y/o no pueden reparar el DNA por recombinación, son más sensibles a Cip que la cepa salvaje, pero no a Caz.

Tabla 7: Concentraciones mínimas inhibitoras (CMI) de Cip y Caz.

Cepa	CMI de Cip (µg/ml)	CMI de Caz (µg/ml)
<i>E.coli</i>		
MG1655nal ^R	0,16	0,32
ME12 (100% idénticas)	0,16	0,32
ME12C (96% idénticas)	0,16	0,32
ME12 <i>recA</i>	0,016	0,32
ME12 <i>CrecA</i>	0,016	0,32
ME12 <i>lexA</i>	0,016	0,32
ME12 <i>ClexA</i>	0,016	0,32
ME12 <i>CmutS</i>	0,16	—
ME12 <i>CrecB</i>	0,016	—
ME12 <i>CrecF</i>	0,16	—
ME12 <i>CrecBrecF</i>	0,016	—
<i>P.aeruginosa</i>		
PAO1	0,12	1
PAO1 <i>mutS</i>	0,12	1

4.1. Inducción de la respuesta SOS por Cip y Caz

Utilizando discos de antibiótico colocados sobre una placa donde previamente se sembró un césped de la cepa MG1655 Nal^{R} (pSC101-*PrecA*::GFP), se comprobó que las concentraciones de antibiótico en las que se observaba una máxima inducción del SOS correspondían a aquellas que estaban alrededor de la CMI (**Figura 16**).

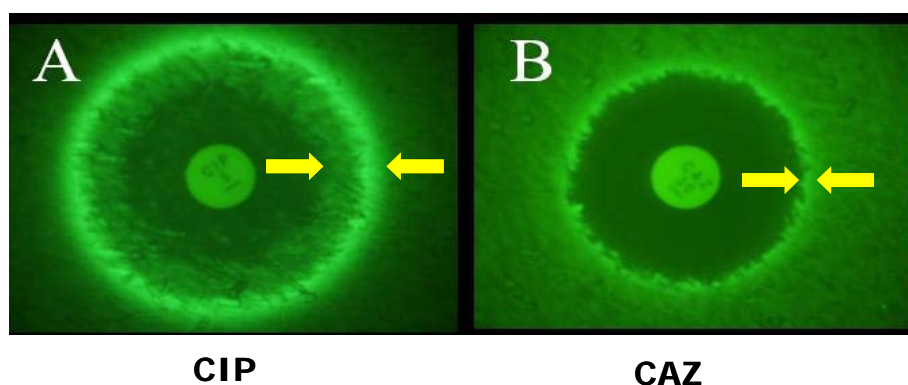


Fig. 16: Inducción del SOS mediada por Cip (A) y Caz (B). Ambos antibióticos inducen la transcripción de *recA* a través de la inducción del sistema SOS y, en ambos casos, la máxima inducción se produce en el borde del halo de inhibición (cerca de la CMI). Las flechas indican el grosor de la zona donde se está produciendo la inducción. Para Cip esta zona es más gruesa que para Caz, lo que indica que el margen de concentraciones de antibiótico en las que se produce la inducción es más amplio en el caso de Cip.

Para verificar el efecto del tratamiento con Cip sobre la inducción del SOS se midió la transcripción de *recA* en la cepa MG1655 Nal^{R} (pSC101-*PrecA*::GFP) (ver apartado 3.7 del material y métodos). Se determinó el tiempo adecuado de tratamiento mediante curvas de crecimiento en presencia de concentraciones subinhibidoras de antibiótico. Se observó que las bacterias presentaban una máxima inducción del SOS con la mínima pérdida de viabilidad a las 4 horas de tratamiento. Se estimó que con el tratamiento con Cip durante 4 horas, a una concentración de $0,16\mu\text{g/ml}$ (que corresponde a la CMI), se producía una disminución de viables de no más de 10 veces con respecto al control no tratado, el cual presenta del orden de 1×10^9 ufc/ml). En la **figura 17** se representa el nivel de la transcripción de *recA* tras 4 horas de tratamiento con concentraciones subinhibidoras crecientes de antibiótico. Se observa cómo la inducción del SOS aumenta según se incrementa la concentración de antibiótico.

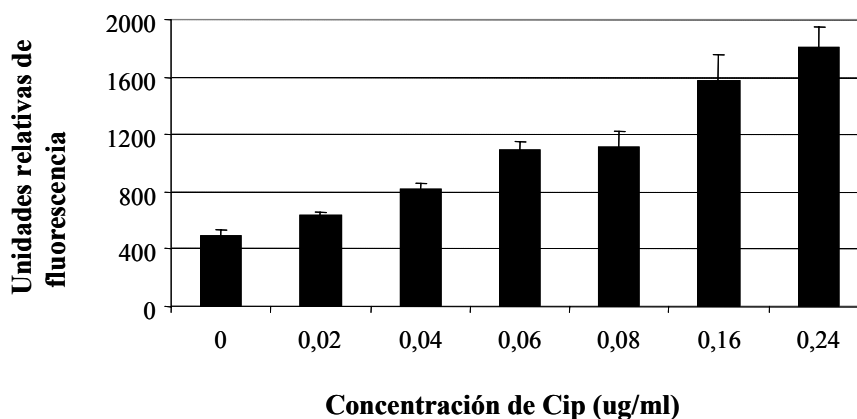


Fig. 17. Nivel de transcripción de *recA* en la cepa MG1655 Nal^R (pSC101- *PrecA*::GFP) medido como la fluorescencia producida tras 4 horas de tratamiento con Cip, normalizado con la DO₆₀₀. La inducción del SOS aumenta según se incrementa la concentración de antibiótico. Las barras de error representan la desviación estándar.

4.2. Antibióticos y recombinación en *E.coli*

Para estudiar el efecto de los antibióticos sobre la recombinación en *E.coli* se utilizaron dos modelos experimentales. Mediante un ensayo directo se midieron las frecuencias de recombinación intracromosómica y mediante experimentos de conjugación se midieron las frecuencias de recombinación intercromosómica. En ambos casos se estudiaron las frecuencias de recombinación entre secuencias idénticas (100% de homología) y entre secuencias divergentes (96% de homología).

4.2.1. Efecto de Cip y Caz sobre la recombinación intracromosómica de *E.coli*.

Para estudiar el efecto del tratamiento con antibióticos inductores del SOS (Cip y Caz) sobre la recombinación intracromosómica se utilizaron las cepas ME12 (para secuencias idénticas) y ME12C (para secuencias con un 4% de divergencia). Estas cepas tienen 2 alelos *lacZ* no funcionales que pueden generar un gen *lacZ* funcional si se da un evento de recombinación intracromosómica. Esto puede medirse como el paso de fenotipo Lac⁻ a Lac⁺, lo que permitiría a los recombinantes crecer en placas de medio mínimo con lactosa como única fuente de carbono. Gracias a la transcripción del gen *yfp* también puede medirse directamente a través de la fluorescencia que se produce en las bacterias donde se ha dado el evento de recombinación (ver material y métodos, apartado 3.5.1). En la **figura 18** se ve cómo el tratamiento con Cip provoca un aumento de fluorescencia derivado del incremento del el número de eventos de recombinación.

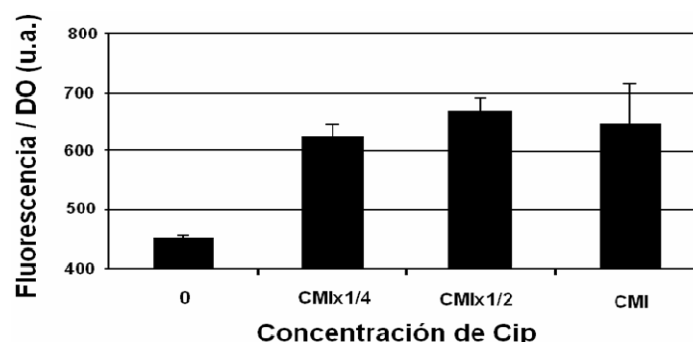


Fig. 18: Efecto del tratamiento durante 4 horas con concentraciones subinhibidoras de Cip sobre la recombinación homóloga, detectado por fluorescencia. El tratamiento con Cip incrementa el número de eventos de recombinación, lo que se traduce en un incremento en la fluorescencia. Las barras de error representan la desviación estándar.

Para estudiar cómo Cip y Caz afectan a las frecuencias de recombinación intracromosómica se utilizó el número de colonias Lac⁺ que aparecen cuando se produce recombinación en las cepas ME12, ME12C y derivados. Como se observa en la **figura 19**, el tratamiento con concentraciones subinhibidoras de Cip y Caz estimulan la recombinación. El incremento en la recombinación provocado por los tratamientos fue estadísticamente significativo para ambos antibióticos ($p < 0,05$). Este efecto se observó tanto en la recombinación entre secuencias idénticas (**fig.19a**) como entre secuencias divergentes (**fig.19b**). En los dos casos el efecto del tratamiento con Cip sobre la recombinación fue más patente que el de Caz, llegando a incrementar la capacidad de recombinación, tanto de secuencias idénticas como de secuencias divergentes, hasta casi 6 veces con respecto al control no tratado. En la **tabla 8** se resumen los datos de frecuencias de recombinación y efecto del tratamiento con Cip en la recombinación entre secuencias idénticas y divergentes.

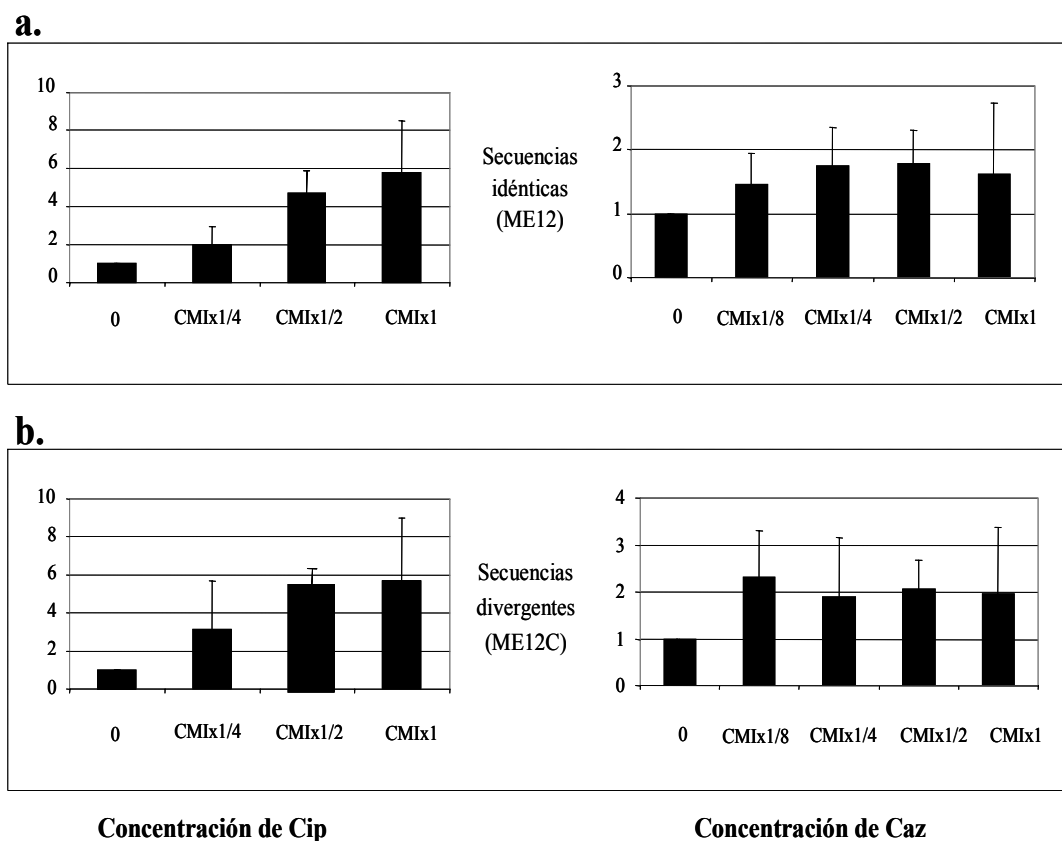


Fig. 19: Incremento de las frecuencias de recombinación intracromosómica, tanto de secuencias idénticas (**a**) como de secuencias divergentes (**b**), tras el tratamiento con concentraciones subinhibidoras de Cip y Caz. En el eje vertical se representa el número de veces que aumenta la frecuencia de recombinación con respecto al control no tratado (concentración 0) y en el eje horizontal se representa la concentración de antibiótico (Cip o Caz) relativa a la CMI. Las barras de error representan la desviación estándar.

Se realizaron los mismos experimentos con los mutantes ME12*recA* y ME12*CrecA* para comprobar la dependencia de RecA en el efecto de los antibióticos sobre la recombinación intracromosómica de secuencias idénticas y divergentes. En ambos casos el tratamiento de estos mutantes con Cip o Caz no aumentaba la frecuencia de recombinación. Se concluyó por lo tanto que la estimulación de la recombinación mediada por Cip y por Caz es absolutamente dependiente de RecA.

4.2.1.1. Dependencia de la inducción del SOS para la estimulación de la recombinación mediada por Cip y por Caz

Para estudiar la dependencia de la inducción del SOS en la estimulación de la recombinación mediada por estos dos antibióticos, se utilizaron los mutantes ME12 *lexA1* y ME12C *lexA1*. Estos mutantes se caracterizan porque tienen un alelo *lexA1* que codifica para una proteína LexA (represor del sistema SOS) que no se puede proteolizar, por lo que el sistema siempre se encuentra reprimido. Se observó que el tratamiento con Caz en los mutantes *lexA1* no estimulaba la recombinación ni de secuencias idénticas ni divergentes, por lo que es necesario que se dispare la respuesta SOS para que éste antibiótico promueva la recombinación. Por el contrario, el tratamiento con Cip en los mutantes *lexA1* sí era capaz de estimular la recombinación, tanto de secuencias idénticas como divergentes, lo que demuestra que no se requiere la inducción del SOS para la estimulación de la recombinación mediada por Cip.

4.2.1.2. Caracterización molecular de las vías implicadas en la estimulación de la recombinación mediada por Cip

Para estudiar cuáles son los requerimientos específicos de la estimulación de la recombinación mediada por Cip se realizaron los mismos experimentos utilizando los mutantes ME12C*recB*, ME12C*recF* y el doble mutante ME12C*recBrecF*. Las vías RecBCD o RecFOR son las principales vías de recombinación en *E.coli*. La vía RecBCD es específica para la recombinación iniciada por roturas de doble hebra (DSBs) mientras que la vía RecFOR es principalmente responsable de la recombinación iniciada por roturas de hebra simple (SSGs) aunque, gracias a la acción combinada de la helicasa RecQ y la exonucleasa RecJ, esta última puede también actuar en DSBs. Al realizar los experimentos con los mutantes simples *recB* y *recF* se vio que el tratamiento con Cip promovía la recombinación (**tabla 8**) por lo que, aparentemente, la inactivación de *recB* o *recF* no tienen efecto en la estimulación de la recombinación de secuencias divergentes mediada por Cip. Sin embargo, al tratar el doble mutante *recB recF* con este antibiótico, no se producía incremento de la recombinación (**tabla 8**). Esto sugiere que la inducción de la recombinación de secuencias divergentes mediada por Cip, puede ocurrir a través de cualquiera de las vías RecBCD o RecFOR.

4.2.1.3. Efecto del sistema MMR en la estimulación de la recombinación mediada por Cip

El MMR es un sistema de reparación post-replicativo encargado de reparar los posibles emparejamientos erróneos que puedan ocurrir durante la replicación. Este sistema también inhibe la recombinación entre secuencias divergentes, provocando el aborto de los intermediarios de recombinación cuando existen bases mal apareadas (Rayssiguier *et al.*, 1989; Matic *et al.*, 1995). Un mutante *mutS*, además de ser un hipermutador por no poder reparar los errores producidos durante la replicación, es un hiperrecombinador (de secuencias divergentes). Se estudió el efecto de MutS en la recombinación de secuencias divergentes inducida por Cip. Para ello se utilizó el mutante ME12C*mutS*. Como se observa en la **tabla 8**, la inactivación de *mutS* da lugar a un incremento de la frecuencia de recombinación de secuencias divergentes de 61 veces, pero además, en la cepa ME12C*mutS* tratada con Cip se produce un aumento adicional de 5 veces. Este resultado indica que la frecuencia de recombinación puede verse incrementada por el tratamiento con antibiótico incluso en un hipermutador e hiperrecombinador estable.

Tabla 8: Efecto del tratamiento con Cip en las frecuencias de recombinación entre secuencias idénticas y divergentes en diferentes fondos genéticos

Genotipo	frecuencia de recombinación (media±SD)	Incremento o decremento ^a	N	Incremento o decremento al tratar con Cip ^b (CMIx1/2) (media ±SD)	Incremento o decremento al tratar con Cip (CMI) (media ±SD)	N
ME12 (100% idénticas)	$6,9 \times 10^{-3} \pm 2,0 \times 10^{-3}$	1,00	12	$4,7 \pm 0,35$	$5,8 \pm 2,71$	6
ME12recA	$3,5 \times 10^{-3} \pm 1,4 \times 10^{-3}$	0,50	9	$1,0 \pm 0,78$	$1,0 \pm 0,67$	6
ME12lexA	$2,0 \times 10^{-3} \pm 6,5 \times 10^{-4}$	0,29	12	$2,7 \pm 1,29$	$2,8 \pm 1,59$	9
ME12C (96% idénticas)	$6,2 \times 10^{-6} \pm 2,2 \times 10^{-6}$	1,00	12	$5,6 \pm 1,31$	$5,7 \pm 3,31$	6
ME12CrecA	$3,9 \times 10^{-7} \pm 2,0 \times 10^{-7}$	0,06	8	$1,0 \pm 0,49$	$0,3 \pm 0,11$	6
ME12ClexA	$5,3 \times 10^{-6} \pm 2,2 \times 10^{-6}$	0,85	12	$4,4 \pm 0,94$	$1,6 \pm 0,80$	9
ME12CrecB	$1,5 \times 10^{-6} \pm 6,1 \times 10^{-7}$	0,24	6	$3,7 \pm 0,82$	$9,6 \pm 6,18$	6
ME12CrecF	$2,2 \times 10^{-6} \pm 2,0 \times 10^{-7}$	0,36	6	$7,1 \pm 1,81$	$7,1 \pm 1,80$	6
ME12CrecBrecF	$5,1 \times 10^{-7} \pm 1,5 \times 10^{-7}$	0,08	6	$1,2 \pm 0,34$	$1,0 \pm 0,36$	6
ME12CmutS	$3,8 \times 10^{-4} \pm 7,6 \times 10^{-5}$	61,17	6	$5,0 \pm 2,00$	$7,12 \pm 1,25$	6

a. Indica en incremento o decremento de la frecuencia de recombinación en los mutantes con respecto a la cepa salvaje correspondiente (ME12 o ME12C)

b. Indica el número de veces que se incrementa la recombinación en la cepa tratada con Cip (a la concentración de la CMI) con respecto a la no tratada

N. Número de experimentos independientes.

4.2.1.4. Efecto del tratamiento con concentraciones subinhibidoras de antibiótico sobre la viabilidad de las bacterias

Para establecer adecuadamente la relevancia biológica de la estimulación de la recombinación que se produce en las bacterias al tratar con Cip y Caz, se procedió a estudiar el efecto de estos tratamientos sobre la viabilidad de las células. Para ello se utilizaron distintos métodos que permiten conocer el estado de las células tras el tratamiento con antibiótico durante 4 horas con concentraciones subinhibidoras: Tinción DAPI, para analizar la continuidad de la replicación del DNA, tinción vital, para ver la integridad de la membrana, y medida de la viabilidad tras los tratamientos, para estudiar la capacidad que tienen las bacterias de recuperarse.

El tratamiento de *E.coli* con Cip y Caz da lugar a la formación de filamentos debido a que se inhibe el proceso de septación, pero no de elongación (**fig. 20A**). Los filamentos contienen múltiples nucleoides, como puede verse con la tinción DAPI, lo que indica que se está produciendo la replicación del DNA (**fig.20B**). La tinción diferencial de vivas y muertas demuestra que, tras 4 horas de tratamiento a una concentración de la mitad de la CMI, la mayoría de las bacterias están vivas (**fig.20C**). Tras la retirada del antibiótico, las células son capaces de recuperarse. Cuando el antibiótico desaparece los filamentos se resuelven dando lugar a células simples y vivas (**fig. 20D**).

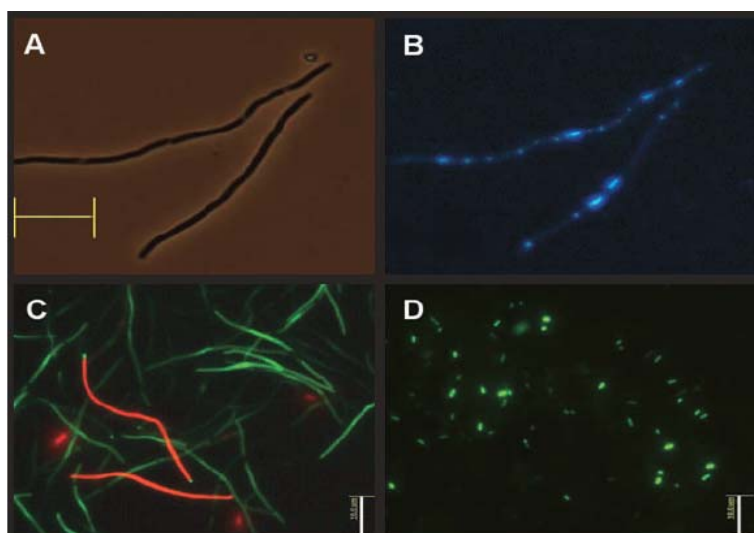


Fig. 20: Células de *E.coli* tratadas con Cip a 0,08μg/ml (CMI x ½), durante 4 horas.

A. Filamentos producidos como consecuencia del tratamiento con Cip

B. Los mismos filamentos teñidos con DAPI. Se observa que cada filamento está compuesto por múltiples nucleoides.

C. Tinción vital (*live and dead*) de los filamentos. Los filamentos verdes y rojos representan las membranas no dañadas y dañadas respectivamente.

D. Los filamentos se resuelven dando lugar a células individuales cuando se retira el antibiótico y se dejan crecer las bacterias durante la noche en medio fresco. Escala: 10μm.

4.2.2. Efecto de otros antibióticos sobre la recombinación intracromosómica en *E.coli*.

Después de ver que la exposición de las bacterias a concentraciones subinhibidoras de Cip y Caz estimula la recombinación, se decidió ampliar el estudio comprobando si otros antibióticos eran capaces de provocar este mismo efecto. Para el estudio se escogieron antibióticos comúnmente utilizados en clínica para tratar infecciones bacterianas. Se eligieron antibióticos pertenecientes a distintos grupos (según la diana que presentan en la bacteria y según la familia molecular) y se escogió, al menos, un antibiótico de cada grupo. En la **tabla 10** se muestra un resumen de todos los antibióticos utilizados en este estudio. De los 11 antibióticos que en total se han analizado, sólo 3 (Cip, Caz y trimetoprim) están descritos como inductores del sistema SOS (Ysern *et al.*, 1990; Lewin and Amyes 1991; Perez-Capilla *et al.*, 2005). Además se comprobó que de los 11 antibióticos estudiados, efectivamente sólo esos tres inducían el sistema SOS. Para ello se utilizó, como en experimentos anteriores, la cepa MG1655 (pSC101- *PrecA*::GFP).

Se realizaron, con la cepa ME12, los mismos experimentos utilizados para medir el efecto del tratamiento de Cip y Caz en la recombinación intracromosómica. Se hizo un mínimo de 3 experimentos independientes para cada antibiótico.

Se determinaron las CMI's de cada uno de los antibióticos para la cepa ME12, y se siguieron las curvas de crecimiento con concentraciones subinhibidoras de los mismos para estudiar la viabilidad de las bacterias expuestas. Además, mediante microscopía óptica se siguió el efecto de los tratamientos sobre las bacterias y la recuperación de las mismas tras la retirada del antibiótico. Como se observa en la **figura 21**, los tratamientos con cloranfenicol, ampicilina, tetraciclina, imipenem y trimetoprim, afectan, en mayor o menor medida, a la morfología de la bacteria. Tras el estudio de viabilidad se escogieron 5 concentraciones alrededor de la CMI de cada antibiótico para realizar los experimentos: La CMI, dos diluciones dobles seriadas por encima y dos por debajo. Estas cocentraciones permiten una buena recuperación de las bacterias tras la retirada del antibiótico. En la **tabla 9** se muestran las CMI's de los antibióticos. Nuestros resultados demostraron que ninguno de los 9 antibióticos testados producía un incremento significativo ($p < 0,05$) de las frecuencias de recombinación homóloga.

Tabla 9. CMI's (en nuestras condiciones experimentales) para la cepa ME12 de los antibióticos testados para ampliar el estudio del efecto de los antibióticos sobre la recombinación.

ANTIBIÓTICO	CMI ($\mu\text{g/ml}$)
Ampicilina	1
Imipenem	0,05
Cloranfenicol	2
Tetraciclina	0,5
Gentamicina	0,5
Rifampicina	2
Trimetroprim	0,25
Fosfomicina	0,06
Colistina	2

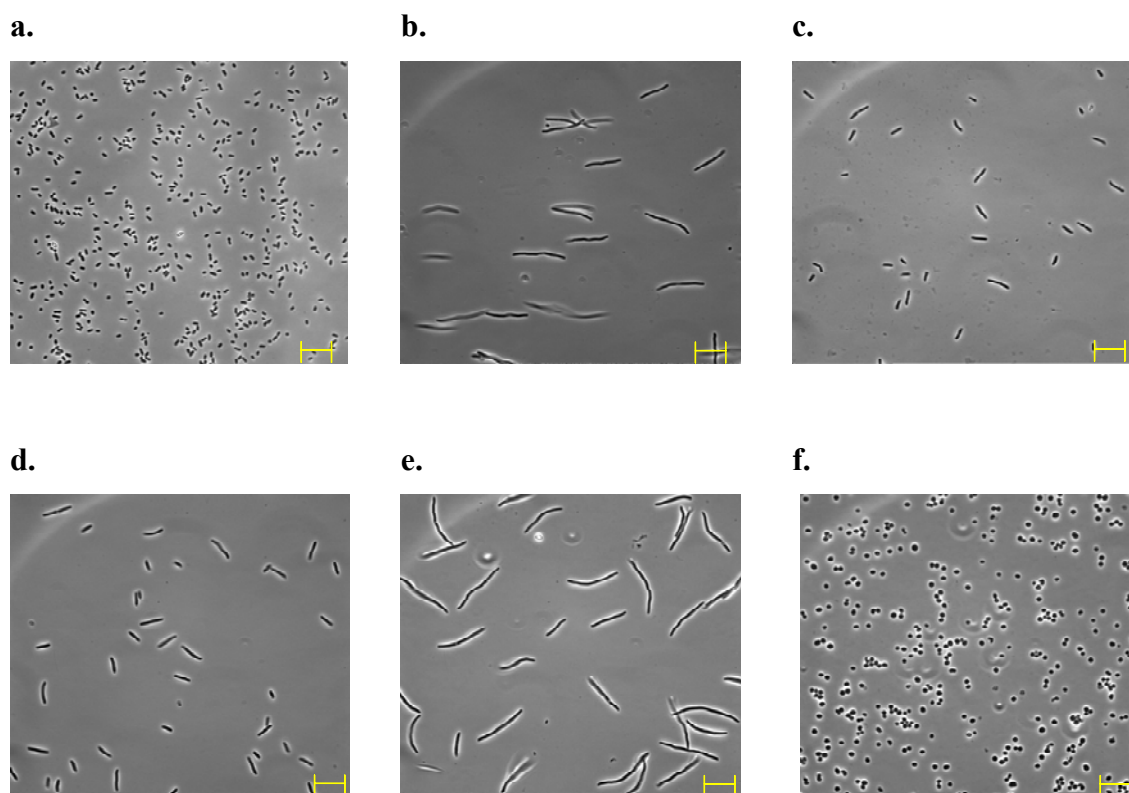


Fig. 21. Células de *E.coli* tratadas con antibióticos durante 4 horas a una concentración 2 veces por encima de la CMI. (a) Control no tratado, (b) ampicilina, (c) cloranfenicol, (d) tetraciclina, (e) trimetoprim, (f) imipenem. Barra de escala: 10 μ m.

Tabla 10. Resumen de los antibióticos utilizados en el estudio del efecto de los antibióticos en la recombinación en *E.coli*.

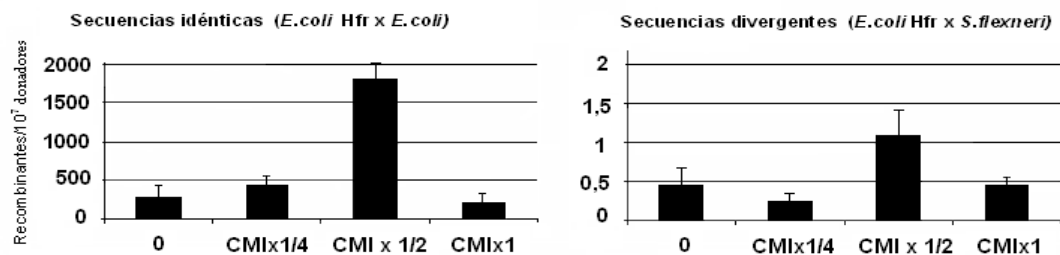
Grupo	Antibiótico escogido	Blanco en la bacteria	Efecto
PENICILINAS (β-lactámico)	Ampicilina	Pared celular	Inhibe la reacción de transpeptidación y de entrecruzamiento del peptidoglicano.
CEFALOSPORINAS (β-lactámico)	Ceftacidima	Pared celular (PBPs) (Principalmente PBP3)	Inhibe la reacción de transpeptidación y de entrecruzamiento del peptidoglicano. Induce la respuesta SOS
CARBAPENEMICOS (β-lactámico)	Imipenem	Pared celular (PBPs) (Principalmente PBP2)	Inhibe la reacción de transpeptidación y de entrecruzamiento del peptidoglicano.
ANFENICOLES	Cloranfenicol	Subunidad 50S del ribosoma	Inhibe la síntesis de proteínas
TETRACICLINAS	Clorhidrato de Tetraciclina	Subunidad 30S del ribosoma	Inhibe la síntesis de proteínas
AMINOGLUCÓSIDOS	Gentamicina	Subunidad 30S del ribosoma	Inhibe la síntesis de proteínas
RIFAMPICINAS	Rifampicina	RNA polimerasa	Bloquea la síntesis de RNA
QUINOLONAS	Ciprofloxacino	DNA-topoisomerasa II (DNA- <i>girasa</i>) y DNA-topoisomerasa IV	Inhibe la replicación del DNA. Induce la respuesta SOS
SULFONAMIDAS	Trimetoprim	Interfieren con el metabolismo del ácido fólico	Se bloquea la síntesis de ácidos nucleicos. Induce la respuesta SOS
FOSFOMICINA	Fosfomicina	Pared celular	inhibe la síntesis del peptidoglicano de la pared celular bloqueando la formación del ácido N-acetilmurámico
POLIMIXINAS	Colistina (polimixinaE)	Membrana plasmática	Alteran la permeabilidad de la membrana produciendo lisis bacteriana

4.2.3. Efecto de Cip sobre la recombinación intercromosómica de *E.coli*.

La transferencia horizontal es el principal mecanismo de diversificación y adquisición de resistencias a antibióticos en procariotas (De La Cruz and Davies 2000). Para estudiar si el Cip puede estimular la recombinación intercromosómica además de la intracromosómica, se llevaron a cabo experimentos de conjugación en los que las células receptoras MG1655 Nal^R fueron tratadas durante 4 horas con distintas concentraciones suhinhidoras de Cip. Además, para estudiar este efecto en la recombinación de secuencias idénticas y divergentes, los cruces se hicieron entre cepas de *E.coli* K-12 y entre *E.coli* K-12 y *Shigella flexneri* respectivamente. El genoma de *S.flexneri* tiene aproximadamente un 4% de divergencia con el de *E.coli* (Vulic *et al.*, 1997).

Como se observa en la **figura 22A**, el tratamiento con Cip provoca un aumento en las frecuencias de recombinación intercromosómica de los receptores, tanto de secuencias idénticas como divergentes, a concentraciones cercanas a la CMI. Para ver si este efecto es debido a que el tratamiento con el antibiótico aumenta la eficiencia de entrada de DNA en las bacterias receptoras, se repitieron los mismos experimentos de conjugación utilizando como donador la cepa *E. coli* MG1655 Rif^R F'*Tn10*. Esta cepa transfiere el episoma F':*Tn10*, que se replica de forma autónoma por lo que no tiene que recombinar con el genoma de la bacteria receptora para que ésta adquiriera la resistencia al antibiótico. De esta manera sólo medimos entrada de DNA. Se vio que el efecto de incremento de recombinación en células tratadas con Cip no era debido a que el tratamiento con antibiótico estuviese provocando una mayor eficiencia de conjugación, es más, a las concentraciones de Cip en las que se observa el mayor incremento en la recombinación, las frecuencias de conjugación se ven ligeramente disminuidas con respecto al control no tratado (**fig. 22B**)

A. RECOMBINACIÓN



B. CONJUGACIÓN

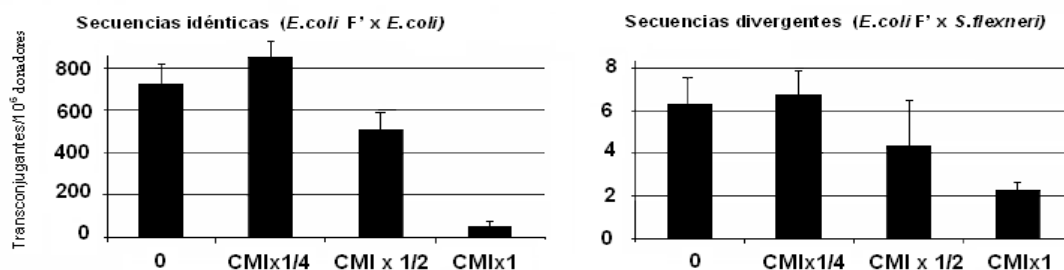


Fig. 22: A. Frecuencias de recombinación conjugacional tras el tratamiento de las bacterias receptoras (MG1655 Nal^R para secuencias idénticas y *S.flexneri* para secuencias divergentes) durante 4 horas a diferentes concentraciones de Cip, y cruzadas con el donador *E.coli* Hfr ELE-1. La exposición de ambos tipos de receptores a una concentración de CMIx1/2 de Cip promueve la recombinación conjugacional.

B. Frecuencias de conjugación del mismo experimento, pero utilizando como donador *E. coli* MG1655 Rif^R F'Tn10. No se observa incremento en las frecuencias de conjugación a la concentración de antibiótico que promueve la recombinación (CMIx1/2).

4.3. ANTIBIÓTICOS Y RECOMBINACIÓN EN *P.aeruginosa*.

Después de comprobar el efecto de Cip y Caz sobre la recombinación inter e intracromosómica en *E.coli*, se decidió estudiar si estos antibióticos tenían el mismo efecto sobre otras especies bacterianas. Se estudió su efecto sobre la recombinación en *P. aeruginosa*, un patógeno oportunista de gran interés clínico contra el que se usan comúnmente estos antibióticos. Para ello se diseñaron experimentos de conjugación en los que la bacteria receptora (*P.aeruginosa* PAO1) fue tratada con concentraciones subinhibidoras de antibiótico (Cip o Caz). Las bacterias donadoras con las que se cruzó fueron *E.coli* S17.1 (pEXTADGm), utilizada para experimentos en los que medimos las frecuencias de recombinación (pEXTADGm es un plásmido suicida que porta el gen *ampD* de PAO1 con un *cassette* de gentamicina en su interior (Juan *et al.*, 2006)) y *E.coli* S17.1(pBR1MSC5-Gm), utilizada para los experimentos en los que medimos las frecuencias de conjugación (pBR1MSC5-Gm es un plásmido movilizable que replica en *P.aeruginosa* (Kovach *et al.*, 1995) (ver material y métodos, apartado 3.5.3.2). Las

frecuencias de conjugación y recombinación de PAO1 (control sin tratar) se encuentran reflejadas en la **tabla 11**.

Para poner a punto las concentraciones de antibiótico y los tiempos de tratamiento, se hicieron curvas de crecimiento y control de viables de PAO1 tratado con concentraciones subinhibidoras de Cip y Caz. Se estimó que para ambos antibióticos el tiempo adecuado de tratamiento era de 3 horas. Las concentraciones de antibiótico que se escogieron para estudiar el efecto de los tratamientos en la recombinación fueron 0,06 y 0,12 µg/ml para Cip y 1 y 8 µg/ml para Caz, que corresponden a ½ CMI y 1xCMI en el caso de Cip y a 1xCMI y 8xCMI en el caso de Caz (**tabla 7**). Las bacterias de *P.aeruginosa* tratadas durante 3 horas con estas concentraciones eran capaces de recuperarse totalmente tras la retirada del antibiótico. Además, ya se había visto en un estudio previo que estas concentraciones inducen la respuesta SOS en *P.aeruginosa* (Blazquez *et al.*, 2006). Para medir las diferencias en las frecuencias de recombinación entre las bacterias tratadas y las no tratadas los datos de recombinación se normalizaron con los de conjugación.

Tabla 11: Frecuencias de conjugación y recombinación de PAO1.

	Frecuencia de conjugación ± SD	Frecuencia de recombinación ± SD	Recombinación /conjugación
PAO1	$7,2 \times 10^{-4} \pm 4,6 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-6} \pm 1,4 \times 10^{-6}$	$3,4 \times 10^{-3}$

Como se observa en la **figura 23**, Cip y Caz promueven la recombinación intercromosómica. Este efecto es mayor en el caso del tratamiento con Caz, en el que el tratamiento de las bacterias receptoras con una concentración de 8 veces la CMI incrementa la recombinación hasta 16 veces con respecto al control no tratado.

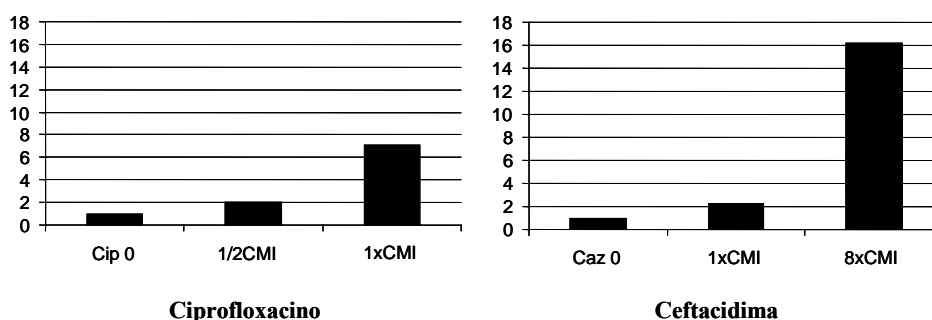


Fig. 23: Incremento de recombinación en *P.aeruginosa* tratada con concentraciones subinhibidoras de Cip y Caz. Los incrementos representan el ratio entre las frecuencias de recombinación y de conjugación.

5. Discusión

5. DISCUSIÓN

5.1. MUTACIÓN Y RECOMBINACIÓN EN LA NATURALEZA

5.1.1. Mutación

En la naturaleza se encuentran con alta frecuencia bacterias con elevadas tasas de mutación. Estudios experimentales (Mao *et al.*, 1997; Leclerc *et al.*, 1998) y teóricos (Boe *et al.*, 2000) indican que la frecuencia de mutadores observada en naturaleza es mucho mayor de la esperada. Un incremento en la frecuencia de mutación debería en principio reducir la eficacia biológica de la bacteria por la acumulación de mutaciones deletéreas. Sin embargo, la elevada proporción de mutadores en la naturaleza sugiere que en determinadas situaciones ser mutador confiere una ventaja selectiva. Existen varios estudios sobre la incidencia de mutadores en la naturaleza. La proporción de mutadores encontrados varía según el estudio realizado; Jyssum *et al.* encontraron 4 mutadores entre 110 aislados patógenos de *E.coli* (3,6% de mutadores) (Jyssum 1960), años después Gross y Siegel observaron un solo mutador (0,24% de la población) entre 408 aislados de *E.coli* (patógenas y comensales), una frecuencia 15 veces menor que la encontrada por Jyssum (Gross and Siegel 1981). En estudios más recientes se han detectado 9 mutadores (2,57% de la población) entre 349 aislados de *E.coli* y *Salmonella*, también patógenas y comensales. Todos los mutadores que encontraron presentaban deficiencias en el MMR (Leclerc *et al.*, 1996). Se ha encontrado una mayor proporción de mutadores en otros trabajos; Matic *et al.* encontraron hasta un 14% de mutadores en un estudio con 504 aislados naturales de *E.coli* (comensales y patógenas), entre los cuales aproximadamente un 1% eran MMR⁻ (Matic *et al.*, 1997). También Baquero *et al.* describieron un alto porcentaje de mutadores en un análisis de 696 cepas naturales de *E.coli*, aunque el porcentaje de mutadores fuertes encontrados fue también del 1% (definen como hipermutadores aquellos que presentan una frecuencia de mutación $\geq 4 \times 10^{-7}$) (Baquero *et al.*, 2004).

En el presente estudio se han analizado 224 aislados naturales de *E.coli* con una proporción muy similar de cepas comensales y patógenas (113 y 111 respectivamente). De las 224 cepas, 15 (6,69%) presentaban fenotipo mutador (frecuencia de mutación al menos 10 veces superior a la de la cepa de referencia *E.coli* K-12 MG1655). El porcentaje de mutadores encontrados en nuestro trabajo es menor que el encontrado por Matic *et al.*, (Matic *et al.*, 1997) a pesar de que un alto porcentaje de cepas de su estudio también han sido utilizadas en el nuestro. Esto puede ser debido, además de a la diferencia en el número

de cepas analizadas, al sistema utilizado para detectar mutadores. Matic *et al.* utilizan un sistema de papilación mediante el cual ven cualquier tipo de mutación que inactive el gen *lacI* (Miller 1992) mientras que nuestro sistema sólo detecta mutaciones de sustitución de base en el gen *rpoB* que confieren resistencia a rifampicina (Jin and Gross 1988). De hecho, algunos de los mutadores que identifican con el sistema de papilación no muestran grandes diferencias con respecto a su cepa control *E.coli* K-12 cuando miden la frecuencia de mutación utilizando rifampicina. Baquero *et al.* también encuentran un porcentaje de mutadores resistentes a rifampicina superior al nuestro (un 23% de mutadores), pero este porcentaje incluye cepas con un fenotipo mutador débil que en nuestro trabajo se han considerado como normomutadores debido al error intrínseco del método (Baquero *et al.*, 2004).

En el presente estudio encontramos además que 6 de los 15 mutadores son hipermutadores (frecuencia de mutación al menos 100 veces superior a la de MG1655). Esto representa un 2,67% del total de la población, un porcentaje también algo superior al encontrado por Matic y Baquero (Matic *et al.*, 1997; Baquero *et al.*, 2004) pero muy similar al encontrado por Leclerc *et al.* (1996). Además, en nuestro estudio se han identificado 6 mutadores previamente caracterizados como defectivos en el MMR. Esto representa que un 2,67% de bacterias son MMR⁻, un porcentaje también ligeramente superior al encontrado por Leclerc y Matic, que fue aproximadamente del 1% para ambos.

Una parte interesante de este estudio es comparar las proporciones de mutadores que aparecen en cepas patógenas y comensales para comprobar si puede establecerse una asociación entre el fenotipo mutador y la patogenicidad. Estudios *in vitro* demuestran que las poblaciones expuestas a continuas fuerzas selectivas presentan un incremento en la proporción de mutadores (Mao *et al.*, 1997). Las fuertes presiones selectivas a las que se ven expuestas las bacterias patógenas, como las defensas de huésped y los antibióticos, favorecerían por lo tanto la selección de estirpes mutadoras. Los resultados de Leclerc *et al.* (1996) trataron de establecer una relación entre la selección de mutadores y la patogenicidad, ya que sólo encontraron mutadores en cepas patógenas, pero el análisis posterior de Matic *et al.* demostró que no existía asociación entre estos dos caracteres (Matic *et al.*, 1997). Estos últimos encontraron mutadores tanto en cepas comensales como en patógenas y la diferencia en la proporción de los mismos en ambos tipos de cepas no era estadísticamente significativa. En el mencionado trabajo de Leclerc *et al.* sólo encontraron mutadores entre las cepas patógenas, pero la desequilibrada proporción de cepas estudiadas de cada tipo (a favor de las patógenas) pudo ser la causa de esta diferencia. Además, hay

otros trabajos donde también se encontraron mutadores en ambos tipo de cepas (Denamur *et al.*, 2002; Baquero *et al.*, 2004).

En el presente estudio se encontraron mutadores en ambos grupos de cepas, aunque el número de mutadores fue mayor en las cepas patógenas que en las comensales (**figura 15**). De los 113 aislados comensales 4 (3,53%) presentaban fenotipo mutador mientras que de las 111 cepas patógenas se encontraron 11 (9,9%) con este fenotipo. Estas diferencias, sin embargo, no son estadísticamente significativas (Mann-Whitney: $p= 0,4$), por lo que no podemos asociar el fenotipo mutador con la patogenicidad. Además, como se muestra en la **figura 15b**, el porcentaje de hipermutadores encontrados en cepas comensales y patógenas fue muy similar (2,65 y 2,7% respectivamente), lo que apoya esta falta de asociación entre los fenotipos, mutador y patógeno.

Otro aspecto interesante de este estudio es la presencia de hipomutadores. Las fuertes presiones selectivas a las que se ven expuestas las bacterias patógenas hacen pensar que adoptar un fenotipo hipomutador, que se caracteriza por una baja tasa de cambio y por lo tanto escasa capacidad de adaptación, no sería una estrategia adecuada para estas bacterias. Por este motivo lo esperado *a-priori* es que no aparezcan este tipo de bacterias en poblaciones patógenas. En este trabajo, donde hemos definido una cepa como hipomutadora cuando su frecuencia de mutación fue al menos 10 veces inferior a la cepa de laboratorio MG1655, se encontraron 5 hipomutadores. Todos pertenecen a la colección de cepas comensales, aunque entre las patógenas aparecen 3 cepas con una frecuencia de mutación muy cercana a la fijada para considerar a una cepa como hipomutadora ($<1 \times 10^{-9}$). Según nuestros resultados no se puede asociar el fenotipo hipomutador con las cepas comensales (Mann-Whitney: $p= 0,5$), pero parece existir cierta tendencia a que aparezcan en mayor proporción en cepas comensales que en patógenas. Esta tendencia está descrita en la bibliografía (Baquero *et al.*, 2004).

Otro objetivo de este estudio fue el de establecer una posible relación entre los niveles de expresión basales de *dinB* y la mutación en cepas naturales. Dado que el gen *dinB* codifica la DNA polimerasa mutagénica Pol-IV y que la sobreexpresión de *dinB* provoca un aumento de la tasa de mutación (Perez-Capilla *et al.*, 2005), niveles de expresión basal de *dinB* superiores podían verse reflejados en frecuencias de mutación más altas. Los resultados de este estudio nos permite establecer dos cosas: (i) no se observan diferencias en los niveles de transcripción basales de *dinB*, ni entre las cepas naturales y la de laboratorio, ni entre las cepas naturales entre sí, y (ii) no se encontró correlación entre los niveles basales transcripción de *dinB* y las frecuencias de mutación. Es decir, que los mutadores no

presentaban mayor nivel basal de transcripción de *dinB*, indicando que los niveles de expresión de este gen no son la causa del fenotipo mutador.

La gran homogeneidad en los niveles de expresión de este gen entre las cepas hace pensar que su expresión está muy regulada. Esta es una característica que se espera encontrar en genes que pertenecen al sistema SOS (de hecho también se observa en *recA*). Los genes de este sistema participan en importantes funciones celulares y su expresión debe estar muy finamente controlada. En concreto *dinB*, que codifica para una polimerasa mutagénica, puede generar graves problemas si su expresión no está perfectamente controlada. Este gen debe incrementar su transcripción sólo cuando a la bacteria le resulte imprescindible un aumento de los niveles de la polimerasa IV para continuar el proceso de replicación (esto es, cuando hay daños en el DNA). Además, recientemente se ha descrito que la sobreproducción de esta proteína inhibe la progresión de la horquilla de replicación y resulta letal para la bacteria (Uchida *et al.*, 2008). Es interesante mencionar que fueron mayores las diferencias entre los niveles de expresión basal del gen *lacZ* de unas cepas y otras, indicando que la regulación de la expresión de este gen no precisa de una regulación tan fina.

5.1.2. Recombinación

Como ya se ha indicado, hay numerosos estudios sobre frecuencias de mutación e incidencia de mutadores e hipermutadores en poblaciones naturales, principalmente en *E.coli* (aunque también en *S. typhimurium* (Leclerc *et al.*, 1996), *N.meningitidis* (Richardson *et al.*, 2002), *H.influenzae* (Watson *et al.*, 2004), *S.aureus* (Prunier *et al.*, 2003), *H.pylori* (Bjorkholm *et al.*, 2001), *S.pneumoniae* (Del Campo *et al.*, 2005) y *P.aeruginosa* (Oliver *et al.*, 2000) pero hay pocos datos sobre la capacidad de intercambiar DNA entre unas bacterias y otras en estas poblaciones. Se sabe que en la naturaleza podemos encontrar aproximadamente un 1% de hipermutadores, pero ¿cuál es la proporción de hiperrecombinadores? Para contestar esta pregunta se ha utilizado uno de los principales mecanismos de transferencia horizontal de DNA: la conjugación. El presente trabajo aporta, por primera vez, información sobre las frecuencias de conjugación y recombinación de cepas naturales de *E.coli* con dos características distintas: aisladas de seres humanos sanos (comensales) o enfermos (patógenas). Se tiene conocimiento de cepas hiperrecombinadoras en la naturaleza a través de los estudios de mutación, ya que, como se explicó en la introducción de esta memoria, los aislados hipermutadores deficientes en el sistema MMR presentan dos rasgos fenotípicos: son a la vez hipermutadores e hiperrecombinadores de

secuencias divergentes (Rayssiguier *et al.*, 1989). Nuestro estudio de recombinación en cepas naturales de *E.coli* aporta datos sobre la capacidad de estas bacterias para modificar su genoma, no solo a través de la mutación, sino de la incorporación de DNA exógeno.

Este estudio se ha llevado a cabo mediante experimentos de conjugación en los que se han utilizado donadores Hfr de dos especies distintas: *E.coli* (para medir recombinación homóloga) y *S.typhimurium* (para medir recombinación homeóloga o de secuencias divergentes). Uno de los primeros aspectos llamativos de este estudio es que, en general, las frecuencias de recombinación tanto homóloga como homeóloga, obtenidas en las cepas naturales, han sido muy bajas (en las **figuras 7 y 13** se muestran las frecuencias de recombinación homóloga y homeóloga de las cepas comensales y patógenas, respectivamente). Por este motivo sólo se han sacado conclusiones, que serán discutidas en este apartado de la memoria, de aquellas cepas en las que en los recuentos de colonias presentaban un número significativo y reproducible de las mismas en los tres experimentos. También hay que tener en cuenta en este estudio, que existe la posibilidad de que un porcentaje de los transconjugantes obtenidos no sean verdaderos recombinantes, sino merodiploides (diploides parciales). Los merodiploides son células receptoras que han incorporado a su cromosoma el DNA de la bacteria donadora, pero no por recombinación, de manera que conservan el gen diana original, por lo que tienen dos copias de dicho gen. También pueden aparecer merodiploides por circularización y mantenimiento en el citoplasma del DNA de la bacteria donadora, como un episoma. Está descrito que la proporción de merodiploides, con respecto al total de transconjugantes, aumenta conforme se incrementa la divergencia genómica entre la bacteria donadora y la receptora (Delmas and Matic 2005). En este trabajo encuentran que casi un 30% de los transconjugantes obtenidos del cruce *S.thipyrium* Hfr SA965 x *E.coli* (wt) son en realidad merodiploides, mientras que en el cruce *E.coli* Hfr P4X x *E.coli* (wt) sólo un 0,5% de los transconjugantes no son verdaderos recombinantes. Dado que las características de estos cruces de conjugación son iguales que las de los nuestros, podríamos esperar un número similar de merodiploides, aunque existe la posibilidad de que este porcentaje sea diferente cuando los receptores son cepas naturales. Por otro lado, los experimentos de Lehner y Hill (Lehner and Hill 1985) indican que cuando se transfieren marcadores cercanos a genes *rrn* el porcentaje de merodiploides puede alcanzar el 100%. Sin embargo, cuando usan otras estirpes donadoras y marcadores situados muy cerca de los usados en nuestro trabajo (y más alejados de los genes *rrn*) el porcentaje de merodiploides es del 19%. En la actualidad se están realizando experimentos en nuestro laboratorio para comprobar el porcentaje de

merodiploides en nuestros cruzamientos. En cualquier caso, sean merodiploides o verdaderos recombinantes, el resultado final es que las cepas naturales tienen mayor capacidad de la esperada para aceptar y mantener DNA divergente.

Una de las posibles causas de las bajas frecuencias de recombinación en las cepas naturales, tanto de secuencias homólogas como divergentes, podría ser una baja eficiencia en la entrada y/o mantenimiento del DNA en la célula receptora. Para obtener información sobre la capacidad de adquirir y/o establecer el DNA de estas cepas se llevaron a cabo experimentos de conjugación con un donador F'. Observamos que estas cepas presentaban, en al mayoría de los casos, una frecuencia de conjugación muy inferior a la de MG1655. Este resultado es en cierto modo esperado porque nuestros experimento de conjugación se han llevado a cabo con un donador *E. coli* K-12. Aunque los impedimentos que pueda tener la bacteria para aceptar y replicar el plásmido F' no tienen que ser necesariamente los mismos que para integrar DNA cromosómico transferido por conjugación a partir de una bacteria Hfr, decidimos utilizar los datos de frecuencia de conjugación para normalizar los de frecuencia de recombinación. Este cociente proporciona una información orientativa de qué proporción de DNA, del que teóricamente capta bacteria, está siendo incorporado al cromosoma. Esta medida, que hemos denominado **porcentaje teórico de recombinación**, muestra que es posible que la capacidad de estas cepas para incorporar a su cromosoma el DNA que consigue entrar en la bacteria, sea mucho mayor que la de la cepa de laboratorio. Sin embargo, sólo es una medida teórica ya que se ha comprobado que en cepas naturales hay una elevada variabilidad en la capacidad de donar y recibir DNA plasmídico (Dionisio *et al.*, 2002), por lo que el hecho de que estas cepas no sean unas buenas receptoras del plásmido F donado por *E.coli* K-12, no significa no puedan recibir DNA de otras bacterias con alta eficiencia. Por otro lado, algunas de las cepas naturales pueden contener un F' o ser Hfr y, por tanto, no permitir la entrada o instalación de otro F. Así pues, no podemos concluir con los resultados de nuestros experimentos de conjugación que las cepas naturales sean poco eficientes en la captación de DNA.

En la cepa de laboratorio el proceso de conjugación es muy eficiente, presumiblemente por que la cepa donadora es, como ella, una *E.coli* K-12. El DNA homólogo recombina con alta eficiencia, pero los sistemas que impiden la recombinación de secuencias divergentes provocan que la fracción de DNA divergente que recombina con su cromosoma sea muy pequeña. Las cepas naturales también recombinan DNA homólogo con alta eficiencia, pero donde presentan ventajas con respecto a la cepa de laboratorio es en la recombinación de secuencias divergentes. Parecen tener muchos menos impedimentos para

llevar a cabo este tipo de recombinación. La alta capacidad de recombinación de secuencias divergentes es precisamente la que tiene mayor importancia evolutiva, ya que éste tipo de recombinación es la que puede aportar nuevos genes, con nuevas funciones, a la bacteria.

Un posible factor que podría explicar las bajas frecuencias de recombinación homóloga en muchas de las cepas comensales, en comparación con la cepa de laboratorio (**figura 7**), es que los porcentajes de homología de las secuencias que recombinan pueden no ser en todos los casos del 100%, como en la cepa control MG1655. A través del análisis de las regiones diana (donde se localiza el marcador de resistencia para nuestra selección) se observó que en muchos casos estos porcentajes de homología eran menores (del 96 al 98%) (**tabla 5**). Sin embargo, se ha comprobado que algunas de las cepas naturales que sí mostraron un porcentaje de homología del 100%, presentaban una frecuencia de recombinación homóloga similar (o menor), que aquellas que tenían porcentajes de homología inferiores, luego no podemos concluir que las bajas frecuencias de recombinación homóloga de las cepas naturales sean debidas a la falta de homología entre las secuencias que recombinan. Aun así, hay que tener en cuenta que la información que proporciona el análisis de las secuencias diana es meramente orientativa ya que la recombinación puede ocurrir en puntos muy alejados de las secuencias que han sido analizadas.

Otro aspecto importante que se ha tenido en cuenta para analizar los resultados es cuánto se diferencian los valores de frecuencia de recombinación homóloga y homeóloga. En la cepa de laboratorio estos valores están más alejados que en la mayoría de las cepas naturales. La medida de esta “distancia” nos la proporciona precisamente lo que hemos definido como **índice de recombinación diferencial (IRD)** (relación entre las frecuencias de recombinación homeóloga y homóloga). Este dato informa de cómo de restrictivos son los sistemas que impiden la recombinación de secuencias divergentes de la bacteria con respecto a las secuencias homólogas. Conviene indicar aquí que, obviamente, el IRD no tiene en cuenta la normalización por conjugación realizada para la recombinación homóloga. El 96,2% de las cepas comensales analizadas presentaron un IRD superior al de MG1655, de hecho en el 63,2% es 1000 veces mayor. El análisis de las regiones de recombinación, aunque es solo orientativo, indica que el alto IRD de estas cepas no es debido a que en las regiones donde supuestamente se produce la recombinación (regiones diana), la homología entre los DNAs que se han considerado como divergentes sea similar o incluso mayor que la de los DNAs que se han considerado como homólogos. Sabemos

además, a través de la secuenciación de DNA ribosomal 16S, que tampoco se debe a que estas cepas sean de una especie distinta a *E.coli*.

Se ha sugerido que existe una asociación entre la recombinación homóloga y la patogenicidad. Esta idea se basa en un estudio en el que, tras analizar el papel de la mutación y de la transferencia horizontal de genes en la diversificación del genoma de bacterias pertenecientes a los 4 principales grupos filogenéticos A, B1, B2 y D, observan que la recombinación es rara en bacterias del grupo A (que contiene en su mayoría cepas comensales o poco patógenas) y sin embargo es muy frecuente en el resto de grupos, a los que pertenecen la mayoría de bacterias patógenas (Wirth *et al.*, 2006). Nuestros resultados, sin embargo, sugieren que las cepas patógenas no presentan mayores capacidades de recombinación que las cepas comensales. El estudio de recombinación en cepas patógenas muestra que, en términos globales, estas cepas se comportan de forma similar a las comensales (**figura 14**), aunque el reducido número de recombinantes obtenido en muchas de las conjugaciones con las patógenas nos impide sacar conclusiones de muchas de ellas. Aun así, las que sí nos aportan información fiable presentan, al igual que las cepas comensales, altos índices de recombinación diferencial y altos porcentajes de recombinación homóloga y homeóloga.

Los elevados índices de recombinación diferencial que presentan las cepas naturales revelan que las barreras a la recombinación interespecífica parecen ser mucho más reducidas en la naturaleza de lo previamente descrito (Rayssiguier *et al.*, 1989; Matic *et al.*, 1995; Vulic *et al.*, 1997). Esto sugiere que los mecanismos encargados de impedir que se lleve a cabo la recombinación de secuencias divergentes que operan en cepas naturales no son tan restrictivos como en las cepas de laboratorio.

La mayor parte de la variación genética de las bacterias se consigue a través de la adquisición de secuencias de otros microorganismos. Utilizando como criterios el contenido atípico en G+C y la frecuencia de uso de codones en las especies, se ha estimado que de un 6 a un 16% del genoma de *E.coli* ha sido adquirido por transferencia horizontal (Medigue *et al.*, 1991). Además, este criterio no tiene en cuenta la transferencia de genes o secuencias similares que han sido homogenizadas por repetidas recombinaciones a lo largo de la evolución, por lo que en realidad el porcentaje de genoma adquirido por transferencia horizontal puede ser aun mayor del estimado (Cebula and Leclerc, 1997).

Cuanto más laxas sean las barreras entre especies, más exitosa será la transferencia horizontal entre ellas y podrá darse entre bacterias filogenéticamente más alejadas. En este trabajo hemos comprobado que la barrera genética que separa *E.coli* de *S.typhimurium*

(especies que presentan aproximadamente un 16% de divergencia) es más laxa en cepas naturales que en la cepa de laboratorio MG1655 y, consecuentemente, menos restrictiva de lo esperado. Esta observación nos permite pensar que las opciones de intercambiar DNA en la naturaleza entre especies filogenéticamente alejadas, son mayores que las estimadas a través de los conocimientos de las restricciones que presentan las cepas de laboratorio.

Se ha sugerido que debido a los estrictos sistemas que impiden la recombinación de secuencias divergentes (MMR), la integración de DNA exógeno por recombinación se daría sólo entre especies muy relacionadas, provocando exclusivamente variaciones en genes existentes en lugar de aportar nuevos genes, sugiriéndose, por lo tanto, que el papel de la recombinación en la diversificación ecológica y fisiológica es insignificante (Ochman *et al.*, 2000). Por otra parte, otros trabajos defienden que la recombinación de secuencias divergentes es la fuerza más importantes que conduce la evolución de las bacterias (Guttman and Dykhuizen 1994; Spratt *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la teoría de que la aportación de la recombinación homeóloga es fundamental en la diversificación de las especies.

Una mayor habilidad para integrar secuencias divergentes por recombinación conllevaría una mejor adaptación a ambientes cambiantes o estresantes (nuevos hospedadores, nuevas propiedades metabólicas, resistencia a antibióticos, etc). De hecho, la diseminación de genes de resistencia a antibióticos entre bacterias patógenas y comensales de humanos y animales, es el paradigma de la transferencia horizontal a gran escala (Mazel and Davies 1999). Por otro lado, la adquisición de islas de patogenicidad a través de transferencia horizontal es la principal contribución a la naturaleza virulenta de muchas bacterias patógenas (Groisman and Ochman 1996).

A pesar del interés de conocer en general las capacidades de recombinación de las cepas naturales, uno de los objetivos de nuestro estudio fue conocer si existen cepas con altas frecuencias de recombinación homeóloga o de secuencias divergentes pero no de mutación, esto es, hiperrecombinadores no mutadores (al hablar de hiperrecombinadoras se hace siempre mención a la recombinación de secuencias divergentes). Las estirpes mutadoras, en concreto las deficientes en el sistema MMR, deben caracterizarse por presentar un IRD mucho más elevado que el de una cepa MMR⁺. De hecho, las cepas naturales de nuestra colección caracterizadas como deficientes en MMR presentan esta característica. Sin embargo, al analizar conjuntamente los datos de mutación y recombinación de todas las cepas, no se encontró correlación entre la frecuencia de mutación y el IRD. Esto es el reflejo de que en este estudio se han encontrado cepas no

mutadoras con elevado IRD (hiperrecombinadoras). Entre estas cepas queremos subrayar la importancia de aquellas que, además de presentar un elevado IRD, tenían unas frecuencias de recombinación homóloga y homeóloga, suficientemente altas ($>1 \times 10^{-8}$) para eliminar el error experimental asociado al recuento de un número demasiado bajo de colonias. En total, se han aislado 16 estirpes hiperrecombinadoras, no mutadoras, con estas características. De las 16 cepas seleccionadas, 13 pertenecen a la colección de cepas comensales y 3 a la de patógenas. Esto representa un 8,29% del total de cepas naturales analizadas. Aunque en el presente estudio no ha sido caracterizada la base molecular del fenotipo hiperrecombinador de estas cepas (esto es, obviamente, uno de los principales objetivos de la continuación de este trabajo) hay al menos tres hipótesis que pueden explicar la existencia de estas estirpes:

(i) Se sabe que las proteínas del sistema MMR (MutS y MutL) controlan recombinación de secuencias divergentes (Worth *et al.*, 1994). Además se ha descrito recientemente que son los niveles de la proteína MutL los que determinan la frecuencia de recombinación de este tipo de secuencias (Elez *et al.*, 2007). Bajas dosis de MutL pero dosis normales de MutS confieren una tasa de mutación normal pero una alta frecuencia de recombinación homeóloga. Es posible, por tanto, que alguna de estas cepas presente esta característica de producir bajos niveles de proteína MutL.

(ii) Estas cepas pueden ser ex-mutadores deficientes en el sistema MMR que de alguna manera han compensado su fenotipo mutador, pero no el hiperrecombinador. En este trabajo, además de encontrar cepas no mutadoras con altas frecuencias de recombinación, se ha encontrado un mayor número de hiperrecombinadores que de mutadores. Esto indica que las propiedades de mutación e hiperrecombinación pueden ser segregadas por un mecanismo de compensación de una sola de las dos propiedades, en este caso, la mutación. Evidentemente, esta hipótesis requiere de más estudio para ser verificada.

iii) Podrían existir mecanismos desconocidos e independientes del sistema MMR que originasen el fenotipo hiperrecombinador.

El hecho de que se haya comprobado en este estudio que las cepas hiperrecombinadoras no presentaban niveles basales de transcripción de *recA* superiores a los del resto de las cepas ni a los de la cepa MG1655, demuestra que ésta no es la causa del fenotipo que presentan. De hecho, como se mencionó anteriormente, los niveles basales de transcripción de *recA* son muy similares en todas las cepas, incluida la MG1655.

5.2. ANTIBIÓTICOS Y RECOMBINACIÓN

Los antibióticos son moléculas letales para las bacterias cuando se suministran en dosis suficientemente altas pero, ¿Qué pasa cuando la bacteria se expone a concentraciones subinhibidoras? ¿Puede la bacteria obtener algún beneficio de la exposición al antibiótico si sobrevive a la misma? Hay diversos estudios que describen cómo algunos antibióticos, a concentraciones subinhibidoras, pueden estimular las dos principales estrategias bacterianas que producen variación genética: la mutación y la transferencia horizontal de secuencias de DNA. Estos estudios se centran fundamentalmente en antibióticos que presentan una característica: disparan la respuesta SOS. Está descrito que las fluoroquinolonas incrementan las frecuencias de mutación de distintas bacterias, tanto gram positivas como gram negativas, a través de la inducción del sistema SOS. Este es el caso de *E. coli*, *S. typhimurium*, *Mycobacterium fortuitum* y *S. pneumoniae* (Ysern et al., 1990; Gillespie et al., 2005; Henderson-Begg et al., 2006). También se ha descrito el efecto de antibióticos inductores del SOS en la transferencia horizontal de genes. Por ejemplo, la mitomicina C y el ciprofloxacino promueven la movilización de elementos conjugativos que se integran (ICEs, del inglés *integrating conjugative elements*) en *Vibrio cholerae* (Beaber et al., 2004) y la transferencia de islas de patogenicidad que codifican para factores de virulencia en *S. aureus* (Ubeda et al., 2005). También ha demostrado que las fluoroquinolonas inducen la transformación del DNA, vía competencia, en *S. pneumoniae* (Prudhomme et al., 2006).

Las fluoroquinolonas son antibióticos de amplio espectro que bloquean la replicación del DNA al unirse a la DNA girasa y a la DNA topoisomerasa IV (Drlica and Zhao 1997). El bloqueo de la replicación dispara la respuesta SOS, lo que incrementa los niveles de RecA en la bacteria. Como RecA promueve la recombinación homóloga entre dos hebras de DNA complementarias (Kowalczykowski et al., 1994), se ha asumido que las fluoroquinolonas deben actuar como promotores de la recombinación homóloga. En este estudio se ha analizado el efecto de la exposición a concentraciones subinhibidoras de distintos antibióticos para establecer: (i) si realmente el tratamiento con antibióticos inductores del SOS promueve la recombinación homóloga en *E.coli* (a través de RecA), (ii) si es necesario que se dispare la respuesta SOS para observar algún efecto en la recombinación, (iii) si estos antibióticos también promueven la recombinación en otras especies como *P.aeruginosa* y, (iv) si otros antibióticos, no inductores de la respuesta SOS, pueden también promover este proceso.

Para contestar estas preguntas se ha analizado la frecuencia de recombinación, tanto de secuencias idénticas (100% de homología) como divergentes (96% de homología). Para

ello se ha utilizado un ensayo directo que permite medir la recombinación de dos secuencias adyacentes en el cromosoma. La frecuencia de recombinación de la cepas silvestre es $6,9 \times 10^{-3}$ para secuencias idénticas y $6,2 \times 10^{-6}$ para secuencias divergentes (**tabla 8**). La recombinación de secuencias divergentes está 1000 veces por debajo que la de secuencias idénticas. Este resultado es acorde con los resultados de los experimentos de conjugación de Vulic *et al.* (1997), donde observan que las frecuencias de recombinación obtenidas en el cruce de especies cuyos genomas divergen un 4% (como por ejemplo *E.coli* Hfr x *S. flexneri*), es aproximadamente 1000 veces inferior a la obtenida en el cruce de dos bacterias de la misma especie (*E.coli* K-12 x *E.coli* K-12)

Para este estudio se utilizaron dos antibióticos inductores del sistema SOS: una fluoroquinolona (ciprofloxacino, Cip) y una cefalosporina (ceftazidima, Caz). Hemos demostrado que la exposición de *E.coli* a concentraciones subletales de ambos antibióticos estimula la recombinación homóloga, tanto de secuencias idénticas como divergentes (**figura 19**). Además, en un mutante *recA* no se observa ningún efecto en recombinación derivado del tratamiento con estos antibióticos, por lo que el incremento en las frecuencias de recombinación es absolutamente dependiente de RecA. Es interesante la observación de que en un mutante *recA*, la bajada en la frecuencia de recombinación entre secuencias idénticas es sólo de la mitad con respecto a la cepa silvestre, mientras que esta bajada es de 16 veces cuando se trata de secuencias divergentes (**tabla 8**). Esta diferencia puede ser debida a que en el caso de secuencias idénticas parte de los eventos de recombinación que se dan entre los dos alelos de *lacZ*, capaces de reestablecer un gen *lacZ* funcional, son *recA*-independientes y probablemente se producen por deslizamientos de la DNA-polimerasa.

El incremento en la recombinación mediado por Caz, aunque estadísticamente significativo ($p < 0,05$), es considerablemente inferior al que provoca Cip. Se ha observado además que el efecto sobre la recombinación del tratamiento con Caz es variable en cada experimento. Como se observa en la **figura 16B**, el margen de concentraciones de Caz que provocan la inducción de *recA* es muy estrecho si se compara por ejemplo con el de Cip (**figura 16A**). Así pues, pequeñas variaciones en la concentración de antibiótico o en el inóculo de bacterias sometidas al tratamiento (el efecto de este antibiótico es muy dependiente de inóculo) podrían explicar porqué los resultados con este antibiótico son más variables que con Cip.

Mediante el uso de un mutante *lexA1* (incapaz de inducir el sistema SOS) se ha obtenido uno de los resultados más interesantes de este apartado de la memoria y es que, si bien Caz necesita que se dispare la respuesta SOS para estimular la recombinación, el efecto

inductor sobre la recombinación de Cip se da de forma independiente a la respuesta SOS. Cip promueve la recombinación en un mutante *lexAI*, aunque en menor medida que en la cepa silvestre (**tabla 8**). Esto refleja que aunque la estimulación de la recombinación mediada por Cip no requiere de la inducción del sistema SOS, éste sí contribuye al suceso, presumiblemente a través del incremento de la expresión de RecA.

Para estudiar cuáles son los requerimientos específicos de la estimulación de la recombinación mediada por Cip se utilizaron mutantes simples y dobles en las principales vías de recombinación en *E.coli* (RecBCD y RecFOR). El tratamiento con Cip promueve la recombinación en los mutantes simples *recB* y *recF*, pero en el doble mutante *recBrecF* el antibiótico no es capaz de producir este efecto. Esto parece indicar que la estimulación de la recombinación mediada por Cip puede ocurrir a través de cualquiera de las vías RecBCD o RecFOR. En *E.coli* el tratamiento con Cip produce roturas de doble hebra en el DNA (DSBs, del inglés *double strand breaks*) debido a la inactivación de la DNA girasa. La vía principal de reparación de los DSBs es RecBCD pero el procesamiento de DSBs también puede ser llevado a cabo por la acción combinada de la helicasa RecQ y la exonucleasa RecJ, que proporcionan un sustrato adecuado para la incorporación de la vía RecFOR (principalmente implicada en la reparación de roturas de hebra simple) (Morimatsu and Kowalczykowski 2003). Esto significa que en ausencia de una vía de recombinación entra la otra, y puede explicar por qué la estimulación de la recombinación dependiente de Cip ocurre a través de cualquiera de las 2 vías (**figura 24**). El hecho de que RecBCD sea la principal vía de reparación de DSBs se refleja en que la CMI del mutante *recB* está 10 veces por debajo de la de la cepa salvaje, mientras que en el mutante *recF* no varía (**tabla 7**), por lo que la reparación de DSBs a través de la vía RecFOR parece ser menos efectiva.

El efecto del tratamiento con Cip en un mutante *recB* es una prueba más de que este antibiótico no precisa de la inducción del sistema SOS para promover la recombinación. Se sabe que el procesamiento de los DSBs a través de RecBCD es un requisito necesario para que se dispare la respuesta SOS tras el tratamiento con quinolonas (Newmark *et al.*, 2005), por lo que un mutante *recB* tampoco debería de ser capaz de disparar la respuesta.

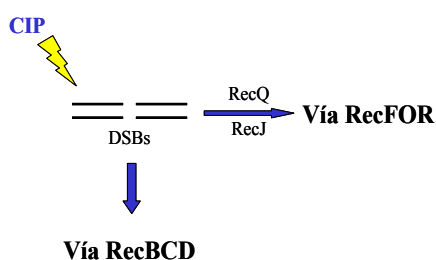


Fig. 24: El tratamiento con Cip inactiva la DNA girasa, lo que da lugar a roturas de doble hebra en el DNA (DSBs). Estas lesiones son normalmente reparadas por RecBCD (principal vía de reparación de DSBs), pero la acción combinada de la helicasa RecQ y la exonucleasa RecJ proporcionan un sustrato adecuado para la incorporación de la vía RecFOR.

El incremento en la frecuencia de recombinación obtenido en un fondo *mutS* es un resultado particularmente interesante dado el fenotipo hipermutador e hiperrecombinador de estos mutantes y su alta frecuencia en la naturaleza. La estimulación de la recombinación mediante el tratamiento con Cip en estas cepas puede conferir una ventaja adicional sobre las citadas.

Para completar el estudio se comprobó si el tratamiento con otros antibióticos, comúnmente utilizados en clínica, podía tener algún efecto sobre la recombinación homóloga. Se analizaron 9 antibióticos pertenecientes a distintos grupos (según la diana que presentan en la bacteria y según la familia molecular) (**tabla 10**). Ninguno de ellos produjo un incremento significativo ($p < 0,05$) de las frecuencias de recombinación homóloga. El hecho de que ni siquiera el trimetoprim, que es un antibiótico descrito como inductor del sistema SOS (Lewin and Amyes 1991) fuese capaz de estimular la recombinación, apoya la idea de que la estimulación de la recombinación mediada por antibióticos es independiente a la inducción del SOS. Además, puesto que varios de los antibióticos probados producen filamentación pero no aumento en la recombinación, se puede descartar el efecto de la filamentación en la estimulación de la frecuencia de recombinación.

La mayor parte de este estudio se ha centrado en la recombinación de secuencias divergentes. La recombinación de este tipo de secuencias tiene especial importancia evolutiva. Como ya hemos comentado, la adquisición de nuevas secuencias mediante mecanismos de transferencia horizontal permite a la bacteria aprovecharse de los procesos de evolución de otros microorganismos. Esta estrategia es muy eficiente y puede resultar en la adquisición de nuevas habilidades en un solo paso. Sin embargo, para que este DNA proporcione suficiente novedad debe ser necesariamente distinto (divergente). Por este motivo también hemos estudiado el efecto de los antibióticos en la transferencia horizontal de genes y hemos comprobado que el tratamiento con Cip también estimula la recombinación de DNA transferido por conjugación a través de una bacteria Hfr (esto es, la recombinación intracromosómica). Además este efecto se da tanto en los cruces intraespecíficos (*E.coli* Hfr x *E.coli*) como interespecíficos, donde donador y receptor tienen una divergencia genómica del 4% aproximadamente (*E.coli* Hfr x *S.flexneri*). Este efecto no se debe a que el tratamiento con antibiótico provoque un incremento en la transferencia de DNA ya que no aumenta el número de transconjugantes cuando la cepa donadora es una cepa F' (**figura 22**).

El efecto de los antibióticos en la recombinación se ha estudiado también en *P.aeruginosa*. Los tratamientos con Cip o Caz también promueven la recombinación

intercromosómica en esta bacteria (**figura 23**). *P.aeruginosa* es un patógeno oportunista que se caracteriza por su gran versatilidad metabólica. Puede habitar nichos muy diferentes (terrestres, acuáticos, y asociados a un huésped animal o vegetal). También causa importantes infecciones en humanos, afectando principalmente a pacientes en estado crítico en las unidades de cuidados intensivos (Vincent 2003) y a enfermos de fibrosis quística, donde provoca infecciones crónicas del sistema respiratorio (Lyczak *et al.*, 2002). La versatilidad de este microorganismo incluye su gran capacidad para desarrollar resistencias a antibióticos, lo que realmente representa un grave problema. Se ha sugerido que son precisamente los antibióticos los que favorecen el desarrollo de resistencias a través de diferentes mecanismos que incluyen la selección de cepas hipermutables (Blazquez 2003) y la inducción de mecanismos que generan mutadores transitorios (Perez-Capilla *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en este estudio aportan un mecanismo más de variación genética promovido por los antibióticos que puede además incrementar la posibilidad de propagar resistencias: la recombinación de secuencias adquiridas por transferencia horizontal. Esto puede tener gran relevancia ya que recientemente se ha demostrado que hay un enorme flujo de genes en las poblaciones de *P.aeruginosa* (Wiehlmann *et al.*, 2007), probablemente mediado por conjugación (Qiu *et al.*, 2006), por lo que la transferencia horizontal y recombinación de genes parece ser el principal mecanismo de adquisición de nuevas funciones para esta bacteria, incluyendo resistencias a antibióticos.

Los efectos de los antibióticos sobre las bacterias sólo cobran significado si éstas son capaces de recuperarse cuando el antibiótico desaparece. A través de dos tipos de tinciones de células (tinción de “vivas muertas” y DAPI) hemos comprobado los efectos de los tratamientos con concentraciones subinhibidoras de Cip y Caz sobre la viabilidad de las células. Una de las características de la exposición a estos agentes es que se produce la formación de filamentos (**figura 20**). La mayoría de las células que los forman están vivas (o mantienen al menos la integridad de su membrana) y además continúan replicando el DNA, por lo que cuando el tóxico desaparece los filamentos se resuelven y las bacterias se recuperan. Doce horas después de la retirada del antibiótico el cultivo tratado presenta el mismo número de viables que el cultivo no tratado. Esto significa que las bacterias pueden obtener un beneficio del estrés al que han sido sometidas.

A la vista de los de este estudio habría que reflexionar sobre si pueden estos resultados tener relevancia clínica. Efectivamente, el margen de concentraciones de antibiótico capaz de producir este tipo de efectos beneficiosos sobre la bacteria es muy estrecho, pero hay enorme diversidad espacial y temporal de gradientes de concentración de antibiótico que

pueden ocurrir en el cuerpo humano (Baquero *et al.*, 1998). Por este motivo las concentraciones subinhibidoras capaces de estimular la recombinación no deberían de ser difíciles de encontrar. Además, aunque los antibióticos se utilizan fundamentalmente para combatir patógenos, las bacterias comensales que habitan en el organismo también están expuestas a estos agentes. Aunque las infecciones están generalmente producidas por un número relativamente pequeño de células (10^8 - 10^9), alrededor de 10^{14} células procariotas pertenecientes a cientos de especies conforman nuestra flora comensal (Andremont, 2003) y estas especies tienen distintos niveles intrínsecos de susceptibilidad a antibióticos como las fluoroquinolonas (Zhanel *et al.*, 2002). Además, algunas especies de la flora comensal pueden causar infecciones oportunistas. Tal es el caso de bacterias que forman parte de la flora indígena intestinal que pueden translocarse a través de la barrera mucosa causando infecciones sistémicas en pacientes inmunodeprimidos (Berg 1996). Así que si se considera la cantidad de bacterias que se exponen a los tratamientos el problema clínico de suministrar este tipo de antibióticos puede adquirir nuevas dimensiones. Cada año se usan toneladas de fluoroquinolonas para tratar millones de infecciones humanas y veterinarias y también se utilizan para promover el crecimiento animal. Este hecho incrementa las probabilidades de encontrar las condiciones adecuadas para la estimulación de la recombinación.

Se ha visto que durante la terapia con antibióticos que disparan la respuesta SOS las bacterias pueden adquirir resistencias a los mismos a través de mutaciones puntuales. Esto ocurre por la acción de las polimerasas mutagénicas (Ysern *et al.*, 1990; Perez-Capilla *et al.*, 2005). Como los genes que codifican para estas polimerasas están controlados por LexA, se ha sugerido que la prevención de la proteólisis de LexA durante el tratamiento con antibióticos como Cip podría evitar la capacidad de las bacterias de desarrollar resistencia (Cirz *et al.*, 2005). De acuerdo con nuestros resultados sería más conveniente inhibir RecA, en lugar de LexA, ya que así se podría prevenir el desarrollo y propagación de resistencias tanto por mutación como por recombinación.

Los resultados de este estudio añaden otro aspecto a los posibles efectos colaterales del uso de antibióticos, como son, mutagénesis (Ysern *et al.*, 1990), incremento de la movilización de DNA en las células tratadas (Beaber *et al.*, 2004), incremento en la capacidad de transformación genética en especies competentes naturales (Prudhomme *et al.*, 2006) y ahora, además, incremento de la recombinación genética, tanto de secuencias idénticas como divergentes (Lopez *et al.*, 2007). Aún así, a pesar de estas consideraciones, los posibles efectos de fluoroquinolonas y cefalosporinas en la evolución y propagación de resistencias requeriría de estudios *in vivo* para clarificarse.

Además del interés de hacer trabajos *in vivo*, el estudio de la mutación y la recombinación en bacterias naturales expuestas a Cip y Caz completaría el trabajo de esta memoria. Estos datos permitirían estimar en qué medida la exposición a los ciertos antibióticos puede estar afectando a las capacidades de generar cambios en el genoma, mediante mutación y recombinación en este tipo de cepas, y cómo están por lo tanto influyendo en su proceso evolutivo. Ya hemos comprobado mediante el estudio de la recombinación en cepas naturales que no siempre puede extrapolarse a la naturaleza lo que observamos en las cepas de laboratorio. También hemos comprobado que un mismo antibiótico no afecta de la misma manera a la expresión de ciertos genes en una cepa de laboratorio y en las naturales. Por ejemplo, existen notables diferencias en la inducción de *recA* mediada por Cip, entre la cepa de laboratorio MG1655 y las cepas comensales (**figura 11**).

6. Conclusiones

6. CONCLUSIONES

1. En una colección de 224 estirpes naturales de *E.coli* encontramos un 6,69% de cepas mutadoras y un 2,67% de hipermutadoras. No existen diferencias significativas entre comensales y patógenas, por lo que no podemos asociar estos fenotipos con la patogenicidad.
2. Las frecuencias de recombinación interespecíficas de las cepas naturales de *E.coli* analizadas sugiere que las barreras genéticas que impiden la adquisición y mantenimiento de DNA de *Salmonella typhimurium* son más laxas de lo descrito para *E.coli* K12.
3. Los niveles basales de expresión de los genes *dinB* y *recA* de las cepas naturales de *E.coli* demuestran que no existe correlación con las frecuencias de mutación y recombinación.
4. Los niveles basales de transcripción de *dinB* y *recA* son similares entre las cepas naturales y entre éstas y *E.coli* K12. Sin embargo, los niveles de *dinB* inducidos por ciprofloxacino a las 4 horas son más altos en la mayoría de las cepas naturales que en *E.coli* K12. Por el contrario, los niveles inducidos de *recA* se comportan de forma opuesta.
5. La presencia de cepas no mutadoras, pero con un elevado índice de recombinación diferencial (hiperrecombinadoras), demuestra que los fenotipos hipermutador e hiperrecombinador pueden aparecer de forma independiente en la naturaleza.
6. La exposición de cepas de *E.coli* K12 a concentraciones subinhibidoras de ciprofloxacino y ceftazidima estimula la recombinación intracromosómica, tanto de secuencias idénticas como divergentes, de forma absolutamente dependiente de RecA.
7. La estimulación de la recombinación intracromosómica mediada por ceftazidima depende de la inducción de la respuesta SOS mientras que en el caso de ciprofloxacino es independiente de la misma y ocurre a través de cualquiera de las vías RecBCD o RecFOR.

8. Ninguno de los 9 antibióticos adicionales probados, incluyendo otro inductor del sistema SOS, produjo un incremento significativo de la frecuencia de recombinación.
9. El tratamiento con ciprofloxacino y ceftazidima también estimulan la recombinación en *P.aeruginosa*.
10. Las bacterias se recuperan del tratamiento con antibiótico tras la retirada del mismo, pudiendo así beneficiarse de los cambios provocados por el estrés al que han sido sometidas.

7. Bibliografía

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aertsen, A., Van Houdt, R., Vanoirbeek, K. and Michiels, C. W. (2004). "An SOS response induced by high pressure in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **186**(18): 6133-41.
- Andremont, A. (2003) "Commensal flora may play key role in spreading antibiotic resistance". *ASM News* **69**: 601-606.
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L. and Mori, H. (2006). "Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection." *Mol Syst Biol* **2**: 2006 0008.
- Baquero, F., Negri, M. C., Morosini, M. I. and Blazquez, J. (1998). "Antibiotic-selective environments." *Clin Infect Dis* **27 Suppl 1**: S5-11.
- Baquero, M. R., Nilsson, A. I., Turrientes Mdel, C., Sandvang, D., Galan, J. C., Martinez, J. L., Frimodt-Moller, N., Baquero, F. and Andersson, D. I. (2004). "Polymorphic mutation frequencies in *Escherichia coli*: emergence of weak mutators in clinical isolates." *J Bacteriol* **186**(16): 5538-42.
- Beaber, J. W., Hochhut, B. and Waldor, M. K. (2004). "SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes." *Nature* **427**(6969): 72-4.
- Berg, R. D. (1996). "The indigenous gastrointestinal microflora." *Trends Microbiol* **4**(11): 430-5.
- Bjedov, I., Tenailon, O., Gerard, B., Souza, V., Denamur, E., Radman, M., Taddei, F. and Matic, I. (2003). "Stress-induced mutagenesis in bacteria." *Science* **300**(5624): 1404-9.
- Bjorkholm, B., Sjolund, M., Falk, P. G., Berg, O. G., Engstrand, L. and Andersson, D. I. (2001). "Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(25): 14607-12.
- Blazquez, J. (2003). "Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance." *Clin Infect Dis* **37**(9): 1201-9.
- Blazquez, J., Gomez-Gomez, J. M., Oliver, A., Juan, C., Kapur, V. and Martin, S. (2006). "PBP3 inhibition elicits adaptive responses in *Pseudomonas aeruginosa*." *Mol Microbiol* **62**(1): 84-99.
- Blazquez, J., Morosini, M. I., Negri, M. C. and Baquero, F. (2000). "Selection of naturally occurring extended-spectrum TEM beta-lactamase variants by fluctuating beta-lactam pressure." *Antimicrob Agents Chemother* **44**(8): 2182-4.

- Blazquez, J., Morosini, M. I., Negri, M. C., Gonzalez-Leiza, M. and Baquero, F. (1995). "Single amino acid replacements at positions altered in naturally occurring extended-spectrum TEM beta-lactamases." Antimicrob Agents Chemother **39**(1): 145-9.
- Boe, L., Danielsen, M., Knudsen, S., Petersen, J. B., Maymann, J. and Jensen, P. R. (2000). "The frequency of mutators in populations of Escherichia coli." Mutat Res **448**(1): 47-55.
- Brown, E. W., LeClerc, J. E., Li, B., Payne, W. L. and Cebula, T. A. (2001). "Phylogenetic evidence for horizontal transfer of mutS alleles among naturally occurring Escherichia coli strains." J Bacteriol **183**(5): 1631-44.
- Camas, F. M., Blazquez, J. and Poyatos, J. F. (2006). "Autogenous and nonautogenous control of response in a genetic network." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(34): 12718-23.
- Cave, H., Bingen, E., Elion, J. and Denamur, E. (1994). "Differentiation of Escherichia coli strains using randomly amplified polymorphic DNA analysis." Res Microbiol **145**(2): 141-50.
- Cirz, R. T., Chin, J. K., Andes, D. R., de Crecy-Lagard, V., Craig, W. A. and Romesberg, F. E. (2005). "Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance." PLoS Biol **3**(6): e176.
- Claverys, J. P. and Lacks, S. A. (1986). "Heteroduplex deoxyribonucleic acid base mismatch repair in bacteria." Microbiol Rev **50**(2): 133-65.
- Cooper, V. S. and Lenski, R. E. (2000). "The population genetics of ecological specialization in evolving Escherichia coli populations." Nature **407**(6805): 736-9.
- Cox, E. C. (1976). "Bacterial mutator genes and the control of spontaneous mutation." Annu Rev Genet **10**: 135-56.
- Cox, E. C. and Gibson, T. C. (1974). "Selection for high mutation rates in chemostats." Genetics **77**(2): 169-84.
- Chao, L., and E. C. Cox. (1983). "Competition between high and low mutating strains of Escherichia coli". Evolution **37**:125-134.
- DasGupta, C. and Radding, C. M. (1982). "Lower fidelity of RecA protein catalysed homologous pairing with a superhelical substrate." Nature **295**(5844): 71-3.
- Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6640-5.

- Datta, A., Adjiri, A., New, L., Crouse, G. F. and Jinks Robertson, S. (1996). "Mitotic crossovers between diverged sequences are regulated by mismatch repair proteins in *Saccaromyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **16**(3): 1085-93.
- de la Cruz, F. and Davies, J. (2000). "Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria." Trends Microbiol **8**(3): 128-33.
- de Visser, J. A. (2002). "The fate of microbial mutators." Microbiology **148**(Pt 5): 1247-52.
- del Campo, R., Morosini, M. I., de la Pedrosa, E. G., Fenoll, A., Munoz-Almagro, C., Maiz, L., Baquero, F. and Canton, R. (2005). "Population structure, antimicrobial resistance, and mutation frequencies of *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis patients." J Clin Microbiol **43**(5): 2207-14.
- Delmas, S. and Matic, I. (2005). "Cellular response to horizontally transferred DNA in *Escherichia coli* is tuned by DNA repair systems." DNA Repair (Amst) **4**(2): 221-9.
- Denamur, E., Bonacorsi, S., Giraud, A., Duriez, P., Hilali, F., Amorin, C., Bingen, E., Andremont, A., Picard, B., Taddei, F. and Matic, I. (2002). "High frequency of mutator strains among human uropathogenic *Escherichia coli* isolates." J Bacteriol **184**(2): 605-9.
- Denamur, E., Lecointre, G., Darlu, P., Tenaillon, O., Acquaviva, C., Sayada, C., Sunjevaric, I., Rothstein, R., Elion, J., Taddei, F., Radman, M. and Matic, I. (2000). "Evolutionary implications of the frequent horizontal transfer of mismatch repair genes." Cell **103**(5): 711-21.
- Dionisio, F., Matic, I., Radman, M., Rodrigues, O. R. and Taddei, F. (2002). "Plasmids spread very fast in heterogeneous bacterial communities." Genetics **162**(4): 1525-32.
- Drake, J. W. (1991). "A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7160-4.
- Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D. and Crow, J. F. (1998). "Rates of spontaneous mutation." Genetics **148**(4): 1667-86.
- Drlica, K. and Zhao, X. (1997). "DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones." Microbiol Mol Biol Rev **61**(3): 377-92.
- Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventre, A., Elion, J., Picard, B. and Denamur, E. (2001). "Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations." Microbiology **147**(Pt 6): 1671-6.
- Echols, H. and Goodman, M. F. (1991). "Fidelity mechanisms in DNA replication." Annu Rev Biochem **60**: 477-511.

- Echols, H., Lu, C. and Burgers, P. M. (1983). "Mutator strains of *Escherichia coli*, *mutD* and *dnaQ*, with defective exonucleolytic editing by DNA polymerase III holoenzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(8): 2189-92.
- Elez, M., Radman, M. and Matic, I. (2007). "The frequency and structure of recombinant products is determined by the cellular level of MutL." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(21): 8935-40.
- Fijalkowska, I. J., Dunn, R. L. and Schaaper, R. M. (1993). "Mutants of *Escherichia coli* with increased fidelity of DNA replication." Genetics **134**(4): 1023-30.
- Fijalkowska, I. J. and Schaaper, R. M. (1993). "Antimutator mutations in the alpha subunit of *Escherichia coli* DNA polymerase III: identification of the responsible mutations and alignment with other DNA polymerases." Genetics **134**(4): 1039-44.
- Funchain, P., Yeung, A., Stewart, J., Clendenin, W. M. and Miller, J. H. (2001). "Amplification of mutator cells in a population as a result of horizontal transfer." J Bacteriol **183**(12): 3737-41.
- Funchain, P., Yeung, A., Stewart, J. L., Lin, R., Slupska, M. M. and Miller, J. H. (2000). "The consequences of growth of a mutator strain of *Escherichia coli* as measured by loss of function among multiple gene targets and loss of fitness." Genetics **154**(3): 959-70.
- Gillespie, S. H., Basu, S., Dickens, A. L., O'Sullivan, D. M. and McHugh, T. D. (2005). "Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on *Mycobacterium fortuitum* mutation rates." J Antimicrob Chemother **56**(2): 344-8.
- Gillor, O., Vriezen, J. A. and Riley, M. A. (2008). "The role of SOS boxes in enteric bacteriocin regulation." Microbiology **154**(Pt 6): 1783-92.
- Giraud, A., Matic, I., Tenaillon, O., Clara, A., Radman, M., Fons, M. and Taddei, F. (2001). "Costs and benefits of high mutation rates: adaptive evolution of bacteria in the mouse gut." Science **291**(5513): 2606-8.
- Groisman, E. A. and Ochman, H. (1996). "Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps." Cell **87**(5): 791-4.
- Gross, M. D. and Siegel, E. C. (1981). "Incidence of mutator strains in *Escherichia coli* and coliforms in nature." Mutat Res **91**(2): 107-10.
- Guttman, D. S. and Dykhuizen, D. E. (1994). "Clonal divergence in *Escherichia coli* as a result of recombination, not mutation." Science **266**(5189): 1380-3.
- Hastings, P. J., Rosenberg, S. M. and Slack, A. (2004). "Antibiotic-induced lateral transfer of antibiotic resistance." Trends Microbiol **12**(9): 401-4.

- Henderson-Begg, S. K., Livermore, D. M. and Hall, L. M. (2006). "Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on mutation frequency in *Streptococcus pneumoniae*." J Antimicrob Chemother **57**(5): 849-54.
- Herzer, P. J., Inouye, S., Inouye, M. and Whittam, T. S. (1990). "Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*." J Bacteriol **172**(11): 6175-81.
- Hooper, D. C. and Wolfson, J. S. (1985). "The fluoroquinolones: pharmacology, clinical uses, and toxicities in humans." Antimicrob Agents Chemother **28**(5): 716-21.
- Horst, J. P., Wu, T. H. and Marinus, M. G. (1999). "*Escherichia coli* mutator genes." Trends Microbiol **7**(1): 29-36.
- Imhof, M. and Schlotterer, C. (2001). "Fitness effects of advantageous mutations in evolving *Escherichia coli* populations." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(3): 1113-7.
- Ishino, F. and Matsushashi, M. (1981). "Peptidoglycan synthetic enzyme activities of highly purified penicillin-binding protein 3 in *Escherichia coli*: a septum-forming reaction sequence." Biochem Biophys Res Commun **101**(3): 905-11.
- Jin, D. J. and Gross, C. A. (1988). "Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* *rpoB* gene that lead to rifampicin resistance." J Mol Biol **202**(1): 45-58.
- Juan, C., Moya, B., Perez, J. L. and Oliver, A. (2006). "Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues." Antimicrob Agents Chemother **50**(5): 1780-7.
- Jyssum, K. (1960). "Observations on two types of genetic instability in *Escherichia coli*." Acta Pathol Microbiol Scand **48**: 113-20.
- Kibota, T. T. and Lynch, M. (1996). "Estimate of the genomic mutation rate deleterious to overall fitness in *E. coli*." Nature **381**(6584): 694-6.
- Kim, S. R., Matsui, K., Yamada, M., Gruz, P. and Nohmi, T. (2001). "Roles of chromosomal and episomal *dinB* genes encoding DNA pol IV in targeted and untargeted mutagenesis in *Escherichia coli*." Mol Genet Genomics **266**(2): 207-15.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd and Peterson, K. M. (1995). "Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes." Gene **166**(1): 175-6.

- Kowalczykowski, S. C., Dixon, D. A., Eggleston, A. K., Lauder, S. D. and Rehrauer, W. M. (1994). "Biochemistry of homologous recombination in Escherichia coli." Microbiol Rev **58**(3): 401-65.
- LeClerc, J. E., Li, B., Payne, W. L. and Cebula, T. A. (1996). "High mutation frequencies among Escherichia coli and Salmonella pathogens." Science **274**(5290): 1208-11.
- LeClerc, J. E., Payne, W. L., Kupchella, E. and Cebula, T. A. (1998). "Detection of mutator subpopulations in Salmonella typhimurium LT2 by reversion of his alleles." Mutat Res **400**(1-2): 89-97.
- LeClerc, JE & Cebula, TA (1997). "Hypermutability and homeologous recombination: ingredients for rapid evolution". Bull Inst Pasteur **95**:97–106.
- Lederberg, J. and Lederberg, E. M. (1952). "Replica plating and indirect selection of bacterial mutants." J Bacteriol **63**(3): 399-406.
- Lehner, A. F. and Hill, C. W. (1985). "Merodiploidy in Escherichia coli-Salmonella typhimurium crosses: the role of unequal recombination between ribosomal RNA genes." Genetics **110**(3): 365-80.
- Leigh, E. G., Jr. (1973). "The evolution of mutation rates." Genetics **73**: Suppl 73:1-18.
- Lewin, C. S. and Amyes, S. G. (1991). "The role of the SOS response in bacteria exposed to zidovudine or trimethoprim." J Med Microbiol **34**(6): 329-32.
- Little, J. W., Edmiston, S. H., Pacelli, L. Z. and Mount, D. W. (1980). "Cleavage of the Escherichia coli lexA protein by the recA protease." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(6): 3225-9.
- Liu, G., Draper, G. C. and Donachie, W. D. (1998). "FtsK is a bifunctional protein involved in cell division and chromosome localization in Escherichia coli." Mol Microbiol **29**(3): 893-903.
- Lopez, E., Elez, M., Matic, I. and Blazquez, J. (2007). "Antibiotic-mediated recombination: ciprofloxacin stimulates SOS-independent recombination of divergent sequences in Escherichia coli." Mol Microbiol **64**(1): 83-93.
- Luo, Y., Pfuetzner, R. A., Mosimann, S., Paetzel, M., Frey, E. A., Cherney, M., Kim, B., Little, J. W. and Strynadka, N. C. (2001). "Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage." Cell **106**(5): 585-94.
- Lyczak, J. B., Cannon, C. L. and Pier, G. B. (2002). "Lung infections associated with cystic fibrosis." Clin Microbiol Rev **15**(2): 194-222.
- Majewski, J. and Cohan, F. M. (1998). "The effect of mismatch repair and heteroduplex formation on sexual isolation in Bacillus." Genetics **148**(1): 13-8.

- Majewski, J., Zawadzki, P., Pickerill, P., Cohan, F. M. and Dowson, C. G. (2000). "Barriers to genetic exchange between bacterial species: *Streptococcus pneumoniae* transformation." J Bacteriol **182**(4): 1016-23.
- Mao, E. F., Lane, L., Lee, J. and Miller, J. H. (1997). "Proliferation of mutators in A cell population." J Bacteriol **179**(2): 417-22.
- Mason, D. J., Power, E. G., Talsania, H., Phillips, I. and Gant, V. A. (1995). "Antibacterial action of ciprofloxacin." Antimicrob Agents Chemother **39**(12): 2752-8.
- Matic, I., Radman, M., Taddei, F., Picard, B., Doit, C., Bingen, E., Denamur, E. and Elion, J. (1997). "Highly variable mutation rates in commensal and pathogenic *Escherichia coli*." Science **277**(5333): 1833-4.
- Matic, I., Rayssiguier, C. and Radman, M. (1995). "Interspecies gene exchange in bacteria: the role of SOS and mismatch repair systems in evolution of species." Cell **80**(3): 507-15.
- Matic, I., Taddei, F. and Radman, M. (1996). "Genetic barriers among bacteria." Trends Microbiol **4**(2): 69-72.
- Matic, I., Taddei, F. and Radman, M. (2000). "No genetic barriers between *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli* in SOS-induced mismatch repair-deficient cells." J Bacteriol **182**(20): 5922-4.
- Matsuhashi, M., Wachi, M. and Ishino, F. (1990). "Machinery for cell growth and division: penicillin-binding proteins and other proteins." Res Microbiol **141**(1): 89-103.
- Mazel, D. and Davies, J. (1999). "Antibiotic resistance in microbes." Cell Mol Life Sci **56**(9-10): 742-54.
- Medigue, C., Rouxel, T., Vigier, P., Henaut, A. and Danchin, A. (1991). "Evidence for horizontal gene transfer in *Escherichia coli* speciation." J Mol Biol **222**(4): 851-6.
- Michaels, M. L., Cruz, C., Grollman, A. P. and Miller, J. H. (1992). "Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 7022-5.
- Miller, C., Thomsen, L. E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H. and Cohen, S. N. (2004). "SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality." Science **305**(5690): 1629-31.
- Miller, J. H. (1992). A short course in bacterial genetics : a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* related bacteria. New York, : Cols Spring Harbor Laboratory Press.

- Miller, J. H. (1996). "Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair." Annu Rev Microbiol **50**: 625-43.
- Miyake, T. (1960). "Mutator Factor in Salmonella Typhimurium." Genetics **45**(1): 11-4.
- Modrich, P. (1991). "Mechanisms and biological effects of mismatch repair." Annu Rev Genet **25**: 229-53.
- Morimatsu, K. and Kowalczykowski, S. C. (2003). "RecFOR proteins load RecA protein onto gapped DNA to accelerate DNA strand exchange: a universal step of recombinational repair." Mol Cell **11**(5): 1337-47.
- Muller, H. J. (1964). "The Relation of Recombination to Mutational Advance." Mutat Res **106**: 2-9.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2000. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Approved standard M21-A. NCCLS, Wayne, PA.
- Newmark, K. G., O'Reilly, E. K., Pohlhaus, J. R. and Kreuzer, K. N. (2005). "Genetic analysis of the requirements for SOS induction by nalidixic acid in Escherichia coli." Gene **356**: 69-76.
- Ochman, H., Lawrence, J. G. and Groisman, E. A. (2000). "Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation." Nature **405**(6784): 299-304.
- Ochman, H. and Selander, R. K. (1984). "Standard reference strains of Escherichia coli from natural populations." J Bacteriol **157**(2): 690-3.
- Oliver, A., Baquero, F. and Blazquez, J. (2002). "The mismatch repair system (mutS, mutL and uvrD genes) in Pseudomonas aeruginosa: molecular characterization of naturally occurring mutants." Mol Microbiol **43**(6): 1641-50.
- Oliver, A., Canton, R., Campo, P., Baquero, F. and Blazquez, J. (2000). "High frequency of hypermutable Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis lung infection." Science **288**(5469): 1251-4.
- Palmer, B. R. and Marinus, M. G. (1994). "The dam and dcm strains of Escherichia coli--a review." Gene **143**(1): 1-12.
- Parker, B. O. and Marinus, M. G. (1992). "Repair of DNA heteroduplexes containing small heterologous sequences in Escherichia coli." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(5): 1730-4.
- Perez-Capilla, T., Baquero, M. R., Gomez-Gomez, J. M., Ionel, A., Martin, S. and Blazquez, J. (2005). "SOS-independent induction of dinB transcription by beta-

- lactam-mediated inhibition of cell wall synthesis in *Escherichia coli*." J Bacteriol **187**(4): 1515-8.
- Petit, M. A., Dimpfl, J., Radman, M. and Echols, H. (1991). "Control of large chromosomal duplications in *Escherichia coli* by the mismatch repair system." Genetics **129**(2): 327-32.
- Picard, B., Duriez, P., Gouriou, S., Matic, I., Denamur, E. and Taddei, F. (2001). "Mutator natural *Escherichia coli* isolates have an unusual virulence phenotype." Infect Immun **69**(1): 9-14.
- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J. and Denamur, E. (1999). "The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection." Infect Immun **67**(2): 546-53.
- Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B. and Claverys, J. P. (2006). "Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*." Science **313**(5783): 89-92.
- Prunier, A. L., Malbruny, B., Laurans, M., Brouard, J., Duhamel, J. F. and Leclercq, R. (2003). "High rate of macrolide resistance in *Staphylococcus aureus* strains from patients with cystic fibrosis reveals high proportions of hypermutable strains." J Infect Dis **187**(11): 1709-16.
- Qiu, X., Gurkar, A. U. and Lory, S. (2006). "Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of *Pseudomonas aeruginosa*." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(52): 19830-5.
- Quenee, L., Lamotte, D. and Polack, B. (2005). "Combined *sacB*-based negative selection and *cre-lox* antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *pseudomonas aeruginosa*." Biotechniques **38**(1): 63-7.
- Radman, M. (1975). "SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis." Basic Life Sci **5A**: 355-67.
- Rayssiguier, C., Thaler, D. S. and Radman, M. (1989). "The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants." Nature **342**(6248): 396-401.
- Richardson, A. R. and Stojiljkovic, I. (2001). "Mismatch repair and the regulation of phase variation in *Neisseria meningitidis*." Mol Microbiol **40**(3): 645-55.
- Richardson, A. R., Yu, Z., Popovic, T. and Stojiljkovic, I. (2002). "Mutator clones of *Neisseria meningitidis* in epidemic serogroup A disease." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 6103-7.

- Ronen, M., Rosenberg, R., Shraiman, B. I. and Alon, U. (2002). "Assigning numbers to the arrows: parameterizing a gene regulation network by using accurate expression kinetics." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10555-60.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. and Cold Spring Harbor Laboratory of Quantitative Biology (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. New York, : Cold Spring Harbour.
- Shen, P. and Huang, H. V. (1986). "Homologous recombination in Escherichia coli: dependence on substrate length and homology." Genetics **112**(3): 441-57.
- Simon, R., U. Priefer, and A. Puhler. (1983). "A broad range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gramnegative bacteria". Bio/Technology 1:784–791.
- Smith, J. M. and Haigh, J. (1974). "The hitch-hiking effect of a favourable gene." Genet Res **23**(1): 23-35.
- Sniegowski, P. (1997). "Evolution: setting the mutation rate." Curr Biol **7**(8): R487-8.
- Sniegowski, P. D., Gerrish, P. J., Johnson, T. and Shaver, A. (2000). "The evolution of mutation rates: separating causes from consequences." Bioessays **22**(12): 1057-66.
- Sniegowski, P. D., Gerrish, P. J. and Lenski, R. E. (1997). "Evolution of high mutation rates in experimental populations of E. coli." Nature **387**(6634): 703-5.
- Spratt, B. G., Hanage, W. P. and Feil, E. J. (2001). "The relative contributions of recombination and point mutation to the diversification of bacterial clones." Curr Opin Microbiol **4**(5): 602-6.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S. and Olson, M. V. (2000). "Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PA01, an opportunistic pathogen." Nature **406**(6799): 959-64.
- Sutton, M. D., Smith, B. T., Godoy, V. G. and Walker, G. C. (2000). "The SOS response: recent insights into umuDC-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance." Annu Rev Genet **34**: 479-497.
- Taddei, F., Matic, I. and Radman, M. (1995). "cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(25): 11736-40.

- Tenaillon, O., Le Nagard, H., Godelle, B. and Taddei, F. (2000). "Mutators and sex in bacteria: conflict between adaptive strategies." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(19): 10465-70.
- Treffers, H. P., Spinelli, V. and Belser, N. O. (1954). "A Factor (or Mutator Gene) Influencing Mutation Rates in Escherichia Coli." Proc Natl Acad Sci U S A **40**(11): 1064-71.
- Trobner, W. and Piechocki, R. (1984). "Competition between isogenic mutS and mut+ populations of Escherichia coli K12 in continuously growing cultures." Mol Gen Genet **198**(1): 175-6.
- Trobner, W. and Piechocki, R. (1984). "Selection against hypermutability in Escherichia coli during long term evolution." Mol Gen Genet **198**(1): 177-8.
- Trusca, D., Scott, S., Thompson, C. and Bramhill, D. (1998). "Bacterial SOS checkpoint protein SulA inhibits polymerization of purified FtsZ cell division protein." J Bacteriol **180**(15): 3946-53.
- Ubeda, C., Maiques, E., Knecht, E., Lasa, I., Novick, R. P. and Penades, J. R. (2005). "Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci." Mol Microbiol **56**(3): 836-44.
- Uchida, K., Furukohri, A., Shinozaki, Y., Mori, T., Ogawara, D., Kanaya, S., Nohmi, T., Maki, H. and Akiyama, M. (2008). "Overproduction of Escherichia coli DNA polymerase DinB (Pol IV) inhibits replication fork progression and is lethal." Mol Microbiol.
- Vincent, J. L. (2003). "Nosocomial infections in adult intensive-care units." Lancet **361**(9374): 2068-77.
- Vulic, M., Dionisio, F., Taddei, F. and Radman, M. (1997). "Molecular keys to speciation: DNA polymorphism and the control of genetic exchange in enterobacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(18): 9763-7.
- Watson, M. E., Jr., Burns, J. L. and Smith, A. L. (2004). "Hypermutable Haemophilus influenzae with mutations in mutS are found in cystic fibrosis sputum." Microbiology **150**(Pt 9): 2947-58.
- Welsh, J. and McClelland, M. (1990). "Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers." Nucleic Acids Res **18**(24): 7213-8.

- Wiehlmann, L., Wagner, G., Cramer, N., Siebert, B., Gudowius, P., Morales, G., Kohler, T., van Delden, C., Weinel, C., Slickers, P. and Tummler, B. (2007). "Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 8101-6.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. (1990). "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers." Nucleic Acids Res **18**(22): 6531-5.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C., Ochman, H. and Achtman, M. (2006). "Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective." Mol Microbiol **60**(5): 1136-51.
- Worth, L., Jr., Clark, S., Radman, M. and Modrich, P. (1994). "Mismatch repair proteins MutS and MutL inhibit RecA-catalyzed strand transfer between diverged DNAs." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(8): 3238-41.
- Yasuda, T., Morimatsu, K., Horii, T., Nagata, T. and Ohmori, H. (1998). "Inhibition of *Escherichia coli* RecA coprotease activities by DinI." EMBO J **17**(11): 3207-16.
- Ysern, P., Clerch, B., Castano, M., Gibert, I., Barbe, J. and Llagostera, M. (1990). "Induction of SOS genes in *Escherichia coli* and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by fluoroquinolones." Mutagenesis **5**(1): 63-6.
- Zhanel, G. G., Ennis, K., Vercaigne, L., Walkty, A., Gin, A. S., Embil, J., Smith, H. and Hoban, D. J. (2002). "A critical review of the fluoroquinolones: focus on respiratory infections." Drugs **62**(1): 13-59.

Anexo: Publicaciones

Antibiotic-mediated recombination: ciprofloxacin stimulates SOS-independent recombination of divergent sequences in *Escherichia coli*

Elena López,¹ Marina Elez,² Ivan Matic² and Jesús Blázquez^{1*}

¹Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Campus UAM-Cantoblanco. 28049-Madrid, Spain.

²U571 INSERM, Faculté de Médecine, Université René Descartes-Paris V, 156 rue Vaugirard, 75730, Paris Cedex 15, France.

Summary

The widespread use and abuse of antibiotics as therapeutic agents has produced a major challenge for bacteria, leading to the selection and spread of antibiotic resistant variants. However, antibiotics do not seem to be mere selectors of these variants. Here we show that the fluoroquinolone antibiotic ciprofloxacin, an inhibitor of type II DNA topoisomerases, stimulates intrachromosomal recombination of DNA sequences. The stimulation of recombination between divergent sequences occurs via either the RecBCD or RecFOR pathways and is, surprisingly, independent of SOS induction. Additionally, this stimulation also occurs in a hyperrecombinogenic mismatch repair *mutS* mutant. It is worth noting that ciprofloxacin also stimulates the conjugational recombination of an antibiotic resistance gene. Finally, we demonstrate that *Escherichia coli* is able to recover from treatments with recombination-stimulating concentrations of the antibiotic. Thus, fluoroquinolones can increase genetic variation by the stimulation of the recombinogenic capability of treated bacteria (via an SOS-independent mechanism) and consequently may favour the acquisition, evolution and spread of antibiotic resistance determinants.

Introduction

Bacteria must be capable of adapting to the ever-changing environment in order to successfully colonize ecological niches. Three major natural strategies are

involved in the spontaneous generation of genetic variability in bacteria giving rise to diverse populations where the fittest variants are selected. These strategies are: (i) small local changes in the nucleotide sequence of the genome, (ii) intragenomic reshuffling of genomic sequences and (iii) the acquisition of DNA sequences from other organisms via horizontal gene transfer (HGT).

DNA damage is one of the most common types of stress in nature. It triggers the SOS response which involves the induction of *recA* transcription. Contact with single-stranded DNA (ss-DNA) activates the coprotease activity of the RecA protein promoting the self-cleavage of LexA, the SOS transcriptional repressor, leading to the SOS response (Little *et al.*, 1980; Luo *et al.*, 2001). The autogenous control of *lexA* transcription supports a cellular response that is exquisitely proportional to the DNA damage level and prevents false triggering of the SOS response (Camas *et al.*, 2006). RecA has multiple functions that affect different cellular processes, such as the rescue of stalled replication forks (Lusetti and Cox, 2002; Courcelle and Hanawalt, 2003) and coprotease action involved in the autocleavage of the LexA and UmuD proteins needed for both SOS induction and the formation of an active error-prone DNA polymerase V respectively. Finally, mutagenesis increases as a result of SOS induction (Friedberg *et al.*, 2005). It has been stated that some antibiotics, such as fluoroquinolones, increase the frequency of mutants by inducing the SOS response in bacteria (Ysern *et al.*, 1990). Consequently, the phenomenon of SOS mutagenesis may also influence the appearance of antibiotic resistant bacteria (Cirz *et al.*, 2005; Cirz and Romesberg, 2006).

Another function of RecA is to promote homologous recombination between complementary DNA strands (Kowalczykowski *et al.*, 1994) which is crucial for the survival and evolution of bacterial cells. Intragenomic recombination helps to repair collapsed replication forks (Michel *et al.*, 2004) and may also produce gene or operon rearrangements. The recombination of divergent yet related sequences present in the same chromosome may produce short cuts in the development of novel activities. In addition, the strategy of acquiring novel DNA sequences by HGT allows microorganisms to share the evolutionary success of others. This strategy is very

Accepted 15 January, 2007. *For correspondence. E-mail blazquez@cnb.uam.es; Tel. (+34) 91 585 54 33; Fax (+34) 91 585 45 06.

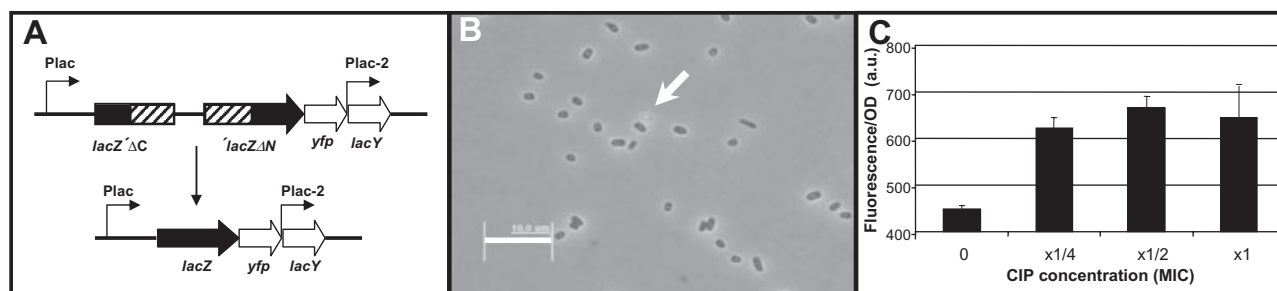


Fig. 1. A. Schematic representation of the Lac region in the strains used to detect recombination events. *lacZ'*ΔC and *lacZ*ΔN (black boxes) are two non-functional *lacZ* alleles with C-terminal or N-terminal deletion respectively. The two alleles share an overlapping DNA region of 1.3 kb (dashed boxes) and are separated by a 569 bp region. One recombination event between the two *lacZ* alleles restores a functional *lacZ* gene. The two *lacZ* alleles are either 100% identical in strain ME12 or 96% identical in strain ME12C. The genes *yfp*, encoding a yellow fluorescent protein, and *lacY*, encoding the lactose permease LacY, are shown as white boxes. The vertical lines with an arrow indicate the position and direction of transcription from *lac* promoters (*Plac*). B. In addition to the production of Lac⁺ colonies (used in this work), recombinant cells (indicated by an arrow) can be visualized as bright cells under fluorescence microscopy. C. Effect of CIP treatment on homologous recombination as detected by yellow fluorescence. For details see text.

efficient and can result in essential novel abilities in a single step. However, to provide sufficient novelty the incoming DNA must unavoidably be different (i.e. divergent). Homologous recombination *in vivo* relies upon the nearly perfect homology between the two complementary DNA strands and on the activity of specialized proteins (Petit *et al.*, 1991). As sequence divergence increases, the frequency of recombination decreases exponentially (Matic *et al.*, 1995; 2000). Apart from plasmids which can replicate autonomously and transposable elements that do not require homologous recombination to be installed in the chromosome, the horizontally transferred DNA must integrate in the bacterial genome via recombination. Recombination of divergent sequences is thus a major driving force in bacterial evolution (Guttman and Dykhuizen, 1994; Spratt *et al.*, 2001).

It has been described that the antibiotic-induced SOS response promotes the transfer of pathogenicity island-encoded virulence factors (Ubeda *et al.*, 2005) and the mobilization of integrating conjugative elements (ICEs) in *Vibrio cholerae* (Beaber *et al.*, 2004), suggesting that mobile genetic elements respond to DNA damage by regulating their escape from damaged bacterial hosts. A recent report has demonstrated that fluoroquinolones induce DNA transformation, via competence, in the naturally competent *Streptococcus pneumoniae* (Prudhomme *et al.*, 2006). Fluoroquinolones are broad-spectrum antibiotics that block DNA replication by trapping DNA gyrase and DNA topoisomerase IV on DNA (Drlica and Hooper, 2003). Because this blockage induces the SOS response, it has been assumed that fluoroquinolones may act as promoters of homologous recombination in treated bacteria. However, to date, this is an unverified assumption and little or nothing is known about the effect of fluoroquinolone on genetic recombination of identical and divergent sequences. Moreover, there is no knowledge as

to whether the stimulation of recombination, should this actually happen, relies upon SOS induction.

In this work we have explored whether (i) ciprofloxacin (CIP), a fluoroquinolone, affects homologous recombination of both identical and divergent DNA sequences, (ii) the induction of the SOS response is necessary for this effect and, if not, which molecular performers are responsible for this CIP-mediated effect, and (iii) cells can recover from the CIP challenge and subsequently benefit from this stress.

Results

Ciprofloxacin stimulates intrachromosomal genetic recombination of both identical and divergent DNA sequences

The SOS response is induced as a result of CIP activity on type-II DNA-topoisomerases (gyrase and topoisomerase IV) (Ysern *et al.*, 1990; Maxwell and Critchlow, 1998). Therefore, we verified the effect of different CIP concentrations on *recA* transcription in the strain MG1655-Nal^R harbouring the pSC101-PrecA::GFP plasmid (Ronen *et al.*, 2002). This low copy number plasmid contains a *gfp* gene located downstream of the *recA* promoter. The level of *recA* transcription increased consistently upon CIP treatment (not shown).

To study the specific effect of CIP on homologous recombination we used a genetic assay that measures intrachromosomal recombination between two non-functional *lacZ* alleles, sharing an overlapping region of 1.3 kb. These alleles are separated by an unrelated region 569 bp long (Fig. 1A) (M. Elez and I. Matic, manuscript submitted). When recombination occurs, a functional *lacZ* gene is reconstructed and the resulting recombinant cells do acquire the ability to grow on

Table 1. Effect of CIP on recombination frequencies between identical and divergent repeats in different genetic backgrounds.

Genotype	Recombination frequencies (mean \pm SD)	Fold difference ^a	N	MIC of CIP ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Increase with CIP ^b ($1/2 \times \text{MIC}$) \pm SD	N
ME12 (100% identical)	$6.9 \times 10^{-3} \pm 2.0 \times 10^{-3}$	—	12	0.16	4.7 ± 0.35	6
ME12C (96% identical)	$6.2 \times 10^{-6} \pm 2.2 \times 10^{-6}$	1.00	12	0.16	5.6 ± 1.31	6
ME12C <i>recA</i>	$3.9 \times 10^{-7} \pm 2.0 \times 10^{-7}$	0.06	8	0.016	1.0 ± 0.49	3
ME12C <i>lexA1</i>	$5.3 \times 10^{-6} \pm 2.2 \times 10^{-6}$	0.85	12	0.016	4.4 ± 0.94	9
ME12C <i>mutS</i>	$3.8 \times 10^{-4} \pm 7.6 \times 10^{-5}$	61.17	6	0.16	5.0 ± 2.00	6
ME12C <i>recB</i>	$1.5 \times 10^{-6} \pm 6.1 \times 10^{-7}$	0.24	6	0.016	3.7 ± 0.82	6
ME12C <i>recF</i>	$2.2 \times 10^{-6} \pm 2.0 \times 10^{-7}$	0.36	6	0.16	7.1 ± 1.81	6
ME12C <i>recBrecF</i>	$5.1 \times 10^{-7} \pm 1.5 \times 10^{-7}$	0.08	6	0.016	1.2 ± 0.34	6

a. Fold difference indicates the increase/decrease with respect to the recombination frequency of the strain ME12C.

b. Increase with CIP refers to the increase in recombination with respect to that obtained without antibiotic challenge.

N, number of independent experiments.

minimal medium plates containing lactose as the sole carbon source. Thus, the production of Lac⁺ colonies indicates the number of recombination events. The presence of the *yfp* gene downstream of *lacZ* allowed us to follow the recombination events directly via the expression of the yellow fluorescent protein (YFP). When the *lacZ* gene is reconstructed by recombination the *yfp* expression increases (Fig. 1B). By measuring the change in fluorescence of the CIP-treated cultures we detected that CIP enhances the number of recombination events proportionally to its concentration (Fig. 1C).

Studies on the effect of CIP on genetic recombination should consider the fact that SOS response leads to impaired cell septation and the production of filaments (see below and Fig. 3). Filamentation reduces the number of colony-forming units while maintaining the number of putative recombinogenic nucleoids, thus leading to an over estimation of the recombination frequency. In our experiments, after the antibiotic-challenging period, the antibiotic is eliminated and the cells are allowed to recover in fresh broth before plating for viables and recombinants. In this way, filaments are resolved forming single cells from each nucleoid.

Appropriate dilutions of treated and recovered cultures were plated onto minimal M9-Lac agar. We found that CIP promoted recombination between identical DNA sequences at concentrations close to the CIP MIC (from 0.02 to 0.08 $\mu\text{g ml}^{-1}$), with the highest increase (4.7-fold) upon treatment with $1/2 \times \text{MIC}$ of CIP (Table 1).

As stated before, recombination of divergent sequences (already carrying novel functions) is one of the main sources of genetic innovation. Therefore, we decided to study the effect of CIP on the recombination of divergent DNA sequences. For this purpose we used a derivative of the genetic system described above, in which the sequences of the two *lacZ* alleles are 4% divergent (strain ME12C). Cultures of ME12C were treated with CIP as previously described for ME12. CIP also pro-

moted recombination between divergent DNA sequences with the highest effect (5.6-fold increase) at a concentration of $1/2 \times \text{MIC}$ (Table 1). To study the effect of RecA on this stimulation of recombination the response of the ME12C *recA* strain was investigated. The MIC of CIP for this strain is 0.016 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (10-fold below that of the wild-type strain ME12C) (Table 1). Thus, the recombination experiments were performed with different concentrations of CIP (doubling concentrations from 0.002 to 0.064 $\mu\text{g ml}^{-1}$). None of these concentrations produced a significant increase in recombination (data not shown) including $1/2 \times \text{MIC}$ (Table 1). Therefore, as expected, the effect of CIP on recombination depends on RecA activity. It is also interesting to note that in the absence of antibiotic challenge 94% of recombinational events producing functional *lacZ* genes are *recA*-dependent (Table 1), while the remaining deletions (6%) are *recA*-independent, probably produced via DNA-polymerase slippage.

The SOS induction is not required for the CIP-mediated stimulation of genetic recombination

As stated above, one consequence of SOS induction is an elevated concentration of the RecA protein. This could be the main cause of the observed increase in recombination (Matic *et al.*, 1995; Delmas and Matic, 2005; Lanzov *et al.*, 2005). To know whether this CIP-mediated stimulation of recombination requires the SOS induction, we performed the experiments with the ME12C *lexA1(ind⁻)* strain. The *lexA1(ind⁻)* allele carries a mutant cleavage-resistant LexA protein that prevents the induction of the SOS response. At a concentration of $1/2 \times \text{MIC}$ of CIP (and also other concentrations; not shown) prevention of SOS induction has a small effect on homologous recombination. The CIP-mediated increase in recombination was 4.4-fold in the *lexA1(ind⁻)* strain (Table 1), thereby clearly indicating that SOS response is unnecessary for the CIP-mediated stimulation of recombination

between divergent DNA sequences. The slight difference in the CIP-mediated increase between the wild type and the *lexA1(ind⁻)* variant (5.6 vs. 4.4 respectively) may indicate a small effect due to the induction of the SOS response, because an elevated RecA dose can produce a further increase in homologous recombination (Matic *et al.*, 1995).

CIP-dependent stimulation of recombination occurs via either the RecBCD or RecFOR pathways

It has been stated that quinolones induce the SOS response via a mechanism requiring the RecBCD nuclease/helicase (Newmark *et al.*, 2005). In addition, RecA/RecBC-mediated recombination seems to be important for cell viability in the presence of CIP (Cirz *et al.*, 2005). To study the specific requirements of CIP-mediated stimulation of homologous recombination, we performed the induction experiments with the mutant strains ME12C *recB*, ME12C *recF* and the double mutant ME12C *recB recF*. In the absence of CIP, the inactivation of either *recB* or *recF* reduces homologous recombination between 4% divergent sequences (Table 1). This result is in accordance with other authors (Kowalczykowski *et al.*, 1994; M. Elez and I. Matic, manuscript submitted). These single *recB* or *recF* mutations have apparently no effect on the increased recombination of 4% divergent DNA sequences produced by CIP (Table 1). The slight difference in the recombination increase observed in the *recB* background with respect to the wild type (3.7 vs. 5.6), as in the case of the *lexA1* mutant, may be due to the fact that SOS induction does not occur in this background (both LexA and RecB are needed for the CIP-mediated induction) (Newmark *et al.*, 2005). Although this induction is not essential, an increase in RecA concentration may be a plus. Moreover, CIP does not increase recombination in the *recB recF* double mutant (Table 1). All together these results strongly suggest that CIP-induced recombination of divergent DNA sequences may follow either the RecBCD or RecFOR recombination pathways.

CIP-mediated induction of recombination is not affected by the mismatch repair system

The mismatch repair system (MMR) inhibits recombination between non-identical DNA sequences (Rayssiguier *et al.*, 1989; Matic *et al.*, 1995). Therefore, we tested the effect of MutS on the CIP-induced recombination events. The inactivation of *mutS* increased the basal rate of recombination events 61-fold (Table 1). However, the absence of an active MMR system (strain ME12C *mutS*) does not impede an additional fivefold increase in recombination frequency (Table 1). This is a particularly significant result because it indicates that recombination

frequency can be further increased, even in a stable hypermutator such as a *mutS* strain. Specifically, there is a 300-fold increase in recombination frequency versus that of the untreated wild type (ME12C) when the *mutS* mutant is treated with CIP.

Ciprofloxacin stimulates the conjugational recombination of an antibiotic resistance gene but not conjugation

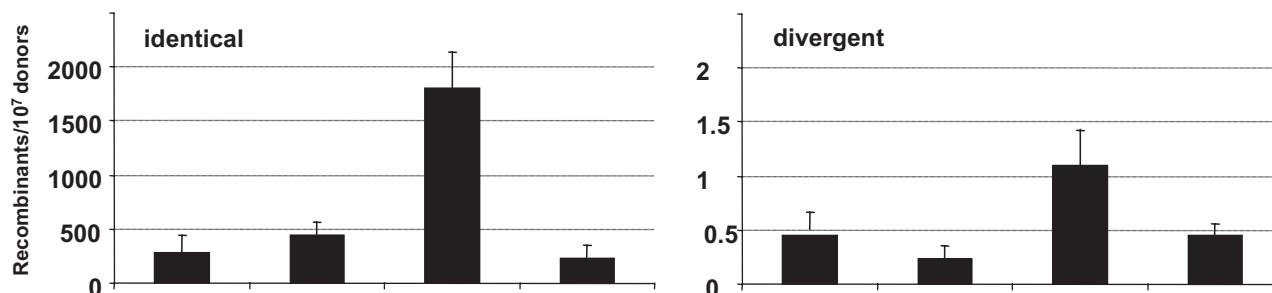
We have shown that CIP increases the frequency of intra-chromosomal recombination of both identical and divergent sequences. However, HGT is a major mechanism of diversification and antibiotic resistance acquisition in prokaryotes (see, for instance, De la Cruz and Davies, 2000 and references therein). To know whether CIP may also stimulate conjugational (inter-chromosomal) recombination and recombinational transfer of antibiotic resistance genes, we studied both identical and divergent conjugational recombination. Conjugations between two *Escherichia coli* strains (identical sequences) and between *E. coli* K12 and *Shigella flexneri* (approximately 5% divergence) (Vulic *et al.*, 1997) were performed. For conjugational recombination between identical sequences, the recipient strain MG1655 *Nal^R* was treated for 4 h at different CIP concentrations. The treated recipient and the untreated donor strain *E. coli* ELE-1 [P4X Hfr ($\Delta fhuD::Kan$)] were allowed to mate for 1 h. Increases in the frequency of recombination were observed at concentrations close to the MIC of CIP for the strain MG1655 *Nal^R* (Fig. 2A). This effect was not the result of an enhanced efficiency of the conjugative transfer, because the F'episome transfer (from *E. coli* MG1655 F':Tn10) did not increase with the CIP treatment (Fig. 2B). A similar experiment was performed to study the conjugational recombination between divergent sequences, except that the recipient strain in this case was the *S. flexneri* strain MM1-*Nal^R*. The treated recipient and donor strain *E. coli* ELE-1 [P4X Hfr ($\Delta fhuD::Kan$)] were mixed for 1 h. As in the case of recombination of identical sequences, the frequency of recombination but not of conjugation increased when the recipient strain was treated with CIP concentrations close to the MIC (Fig. 2A and B).

Thus, our results indicate that antibiotic treatment of the receptor strain also stimulates HGT by increasing DNA recombination in the recipient bacteria.

Biological relevance of responses to CIP

To gain insight on the biological relevance of the stimulatory effect of CIP on recombination we used different methods: DAPI staining, Live/Dead staining and viability measurement after CIP treatment, to analyse the continuity of DNA replication, the integrity of the cell wall during

A Conjugational recombination



B Conjugational DNA transfer

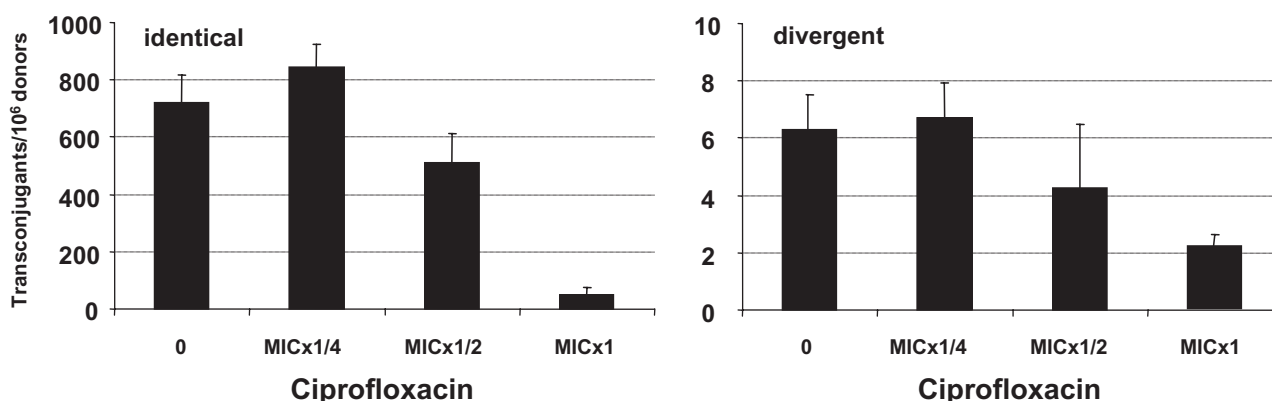


Fig. 2. A. Frequency of conjugational recombination after treatment of the recipient strains, MG1655 Nal^R (identical sequences) and *S. flexneri* (divergent sequences), for 4 h at different CIP concentrations and mating with donor strain *E. coli* ELE-1 (P4X Hfr ($\Delta fhuD::kan$)). B. No increased conjugational transfer was observed with CIP pretreatment of both recipient strains. The donor was MG1655 Rif^R F⁺::Tn10 [*F'* *proAB lacI*^q Δ M15 Tn10 (Tet^R)] and the recipients were MG1655 Nal^R (identical sequences) and *S. flexneri* MM1Nal^R (divergent sequences). Error bars: standard deviation.

CIP treatment and the capacity to recover after the CIP challenge. As expected, *E. coli* cells treated with CIP formed large filaments (Fig. 3A) and these filaments contained multiple nucleoids, as seen by DAPI staining (Fig. 3B), indicating that cell growth also involved chromosome replication. Treated cells were stained with the BacLight Live/Dead dyes showing that, according to generally accepted criteria, many of them were alive (i.e. they conserved membrane integrity) even after a 4 h treatment with CIP (Fig. 3C). CIP-treated cells retained their capacity to recover after the CIP challenge since once the antibiotic disappeared the filaments were resolved giving rise to single cells (Fig. 3D). Interestingly, filamentation was induced by CIP even when the treated strain lacked the *sulA* gene, indicating that Sula is not the only product able to inhibit cell septation (data not shown). Our results are in accordance with those published previously (Blázquez *et al.*, 2006) where filaments of *Pseudomonas aeruginosa* treated with ceftazidime, a PBP3 inhibitor also inducing the SOS response, are resolved originating a number of single cells from the filaments, once the antibiotic disappears.

Finally, Fig. 4 shows that cells (ME12C, ME12C *recA* and ME12C *lexA1*) treated with $1/4 \times$ MIC and $1/2 \times$ MIC of CIP could recover viability at a similar level to the untreated controls after overnight growth in CIP-free medium. When cells were challenged with concentrations of $1 \times$ MIC the number of viable failed to reach that of the untreated control after the incubation period in fresh Luria–Bertani (LB) (Fig. 4). When higher concentrations of CIP were used, viability experienced a sudden decline (not shown).

Discussion

The extended use of antibiotics over the past six decades has caused a major impact, leading to the selection and spread of resistant bacteria. The adaptation of bacterial pathogens to antibiotics is one of the most rapid and striking phenomena of biological evolution generated by mankind, thus paradoxically, antibiotic resistance may be regarded as the outcome of the success of antibiotic therapy.

Seminal studies have demonstrated that the exposure of bacteria to antibacterial agents results in the selection

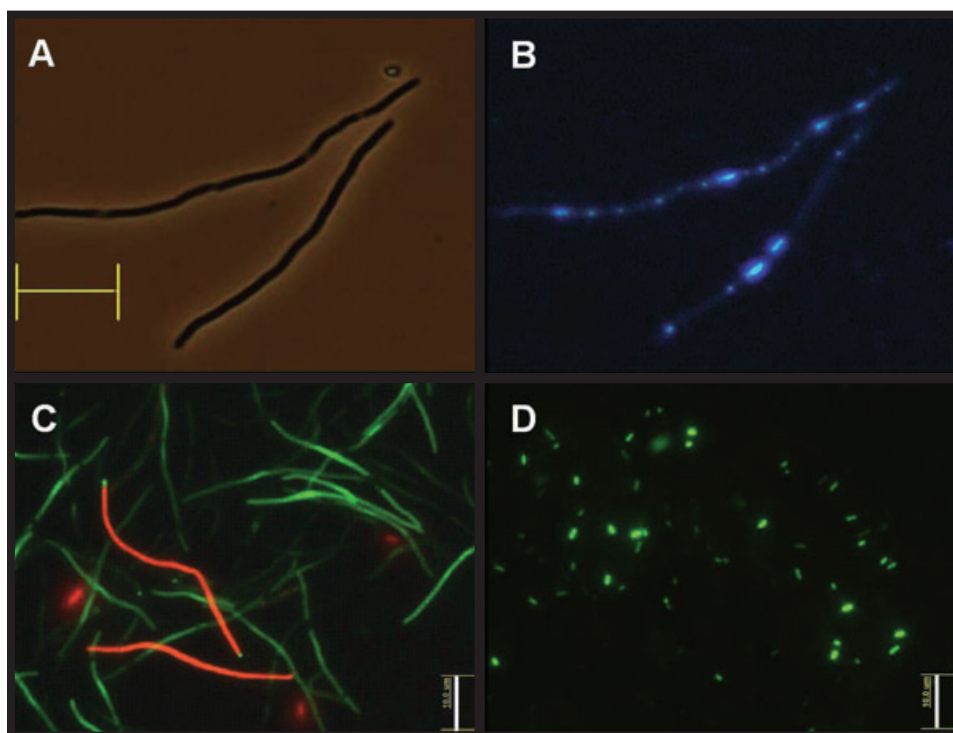


Fig. 3. Visualization of ME12 cells treated with $0.08 \mu\text{g ml}^{-1}$ ($1/2 \times \text{MIC}$) of CIP for 4 h.

A. Typical cell filaments produced by CIP treatment.

B. DAPI staining of the same cell filaments where multiple nucleoids can be observed.

C. Live/dead staining of filaments after 4 h of treatment. Green and red staining indicates undamaged and damaged membrane, respectively (see *Experimental procedures* for details).

D. Filaments produce single cells after overnight growth in fresh LB medium. Scale: $10 \mu\text{m}$.

of pre-existing resistant variants that ultimately become fixed in the population (Luria and Delbrück, 1943; Newcombe, 1949; Lederberg and Lederberg, 1952). Thus, for a long time it has been assumed that antibiotic treatments select for pre-existing 'lucky' antibiotic resistant variants. However, some studies have raised doubts as to whether bacteria are simply passive subjects along their process of evolution by mutation and natural selection (Rosenberg, 2001; Blázquez, 2003; Caporale, 2003). For instance, it has been described that fluoroquinolone antibiotics, by means of SOS induction, may stimulate two major bacterial strategies to produce genetic variation: small local changes in the nucleotide sequence (mutations) and the horizontal transfer of DNA sequences (Ysern *et al.*, 1990; Beaber *et al.*, 2004; Cirz *et al.*, 2005; Ubeda *et al.*, 2005). Interestingly, while this manuscript was being written, a report was published demonstrating that stress produced by fluoroquinolones induces transformability via competence in *S. pneumoniae*, a naturally competent bacteria (Prudhomme *et al.*, 2006). Antibiotics may also select for cells with increased frequency of mutation and recombination (hypermutators) (Mao *et al.*, 1997). Therefore, the possibility of some antibiotics stimulating bacterial mutation

may depict a disturbing prospect for antibiotic resistance induction and spread (Ysern *et al.*, 1990; Power and Phillips, 1993; Pérez-Capilla *et al.*, 2005; Blázquez *et al.*, 2006).

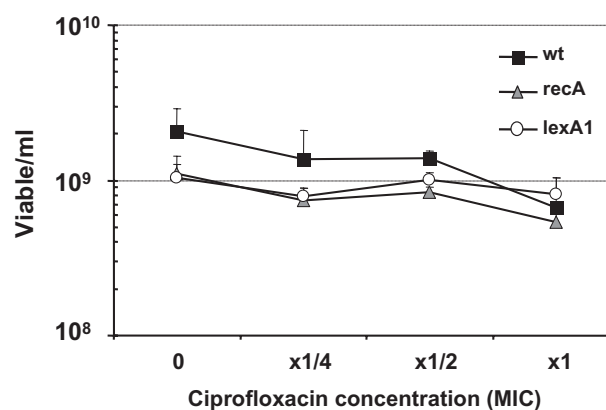


Fig. 4. Viability of ME12C (black squares) and its *recA* (grey triangles) and *lexA1* (white circles) derivatives after 4 h of treatment at different concentrations of CIP and further overnight growth in fresh medium. Viable cells per millilitre of culture were calculated by plating appropriate dilutions on LB-agar plates and subsequently counting the number of colonies. Data are the mean values (\pm standard deviation) of at least three independent experiments.

In addition to mutation, HGT is considered the major diversification mechanism in prokaryotes (Guttman and Dykhuizen, 1994; Lawrence and Roth, 1996; Lawrence and Ochman, 1998). The impact of homologous and divergent recombination on bacterial evolution is evident (Groisman and Ochman, 1996; Katz, 1999; Ochman *et al.*, 2000; Woese, 2000; Spratt *et al.*, 2001). Recombination probably mediates genetic variation in all bacterial species and has possibly been crucial to allowing bacteria to evade immune response, distributing genes that increase virulence and providing increased resistance to antibiotics (De la Cruz and Davies, 2000). For instance, it has been estimated that any single nucleotide change is about 50 times more likely to have occurred by recombination (with a partner carrying such a nucleotide change) than by a *de novo* mutation for *E. coli* in nature (Guttman and Dykhuizen, 1994).

Because fluoroquinolones are known to induce SOS and produce double-strand breaks in DNA (Kreuzer, 2005) and because a higher level of RecA produces increased recombination frequency between divergent sequences (Dimpfl and Echols, 1989; Matic *et al.*, 1995), it wouldn't be too surprising to find CIP stimulating recombination. In fact, it has been suggested that the prevention of LexA cleavage during antibiotic treatment may render bacteria unable to develop antibiotic resistance (Cirz *et al.*, 2005). Here we show that, as expected, CIP also stimulates the intra- and inter-chromosomal recombinogenic ability of the challenged organism, even in bacteria without natural competence. Indeed, the recombination frequency of both identical and divergent DNA molecules is stimulated by CIP. However, the most striking result obtained in this work is that CIP-stimulated recombination does not depend on SOS induction, as this stimulation occurs in a *lexA1* background. Thus, according to the results presented herewith, it appears to be more convenient to inhibit RecA rather than LexA to prevent antibiotic resistance development and spread.

The result indicating that the high rate of recombination can be further increased by CIP in an MMR-deficient mutant is of particular interest, because MMR-deficient strains are stable hypermutators present in natural environments at high frequency. These strains also have increased recombination rates between divergent sequences (Leclerc *et al.*, 1996; Matic *et al.*, 1997; Oliver *et al.*, 2000; 2002; Bjorkholm *et al.*, 2001; Richardson and Stojiljkovic, 2001; Watson *et al.*, 2004). The stimulation of recombination can confer an additional advantage to the treated hypermutators.

The data obtained in *recB*, *recF* and double *recB recF* backgrounds indicate that this stimulation can occur via either the RecBCD or RecFOR pathways. Our results also suggest that at low doses of CIP there are few DNA lesions and that the constitutive concentration of Rec

proteins can easily deal with them. This may be biologically relevant because the constitutive concentration of Rec proteins can help the cells to survive certain types of damage without requiring new protein synthesis via SOS triggering. In fact, this is one of the properties conferred by the autogenous regulation of LexA (Camas *et al.*, 2006). This may be particularly important under conditions where the transcription needed for SOS induction is also inhibited, as can be expected upon CIP challenge (Willmott *et al.*, 1994).

Finally, our results indicate that bacteria can survive long enough at considerable antibiotic doses to produce genomic rearrangements and, should the antibiotic be eliminated or sufficiently reduced, to take advantage of this stress situation.

As concerns the clinical use of antibiotics, the stimulatory effect of fluoroquinolones on genetic mutation, transfer and recombination may be considered too modest to exert any effect on bacterial evolution. However, in Biology small differences sometimes draw a fine dividing line between failure and success. For instance, modest changes in mutation frequency may greatly influence antibiotic resistance development (Denamur *et al.*, 2005). Likewise, modest increases in recombination frequency may have similar effects. The problem may reach new dimensions when considering the vast amounts of bacteria challenged by antibiotic treatments. Although antibiotics are mainly used to combat pathogens they also challenge commensals collaterally. While an infection is usually produced by a relatively small number of cells (10^8 – 10^9), about 10^{14} prokaryotic cells belonging to hundreds of different species conform our commensal flora (Andremont, 2003) and these species have different intrinsic levels of antibiotic susceptibility (Zhanel *et al.*, 2002). Likewise, variability of intraspecific susceptibility can be expected. Furthermore, due to different factors, a huge diversity of spatial and temporal antibiotic concentration gradients may occur in the human body (Baquero *et al.*, 1998). Thus, any particular window of sub-MIC recombination-stimulating concentrations of fluoroquinolones should not be difficult to find. The fact that thousands of tons of fluoroquinolones are used every year to treat billions of human and veterinary infections and to promote animal growth, increases the probability of finding the suitable conditions for the stimulation of recombination.

The results herewith add another twist to the putative side-effects of antibiotics such as mutagenicity, increased DNA transfer from treated donor bacteria, increased genetic transformability in naturally competent species and now, moreover, the increased genetic recombination of both identical and divergent DNA sequences. An increased intragenomic recombination may accelerate genetic variation because larger evolutive distances can

Table 2. Strains and plasmids.

Strain	Genotype/relevant phenotype	Source/construction
<i>E. coli</i>		
MG1655	Wild type	Laboratory stock
MG1655 Nal ^R	Spontaneous Nal ^R mutant	This work
MG1655 Rif ^R	Spontaneous Rif ^R mutant	This work
NEC222 (scavenger)	As MG1655 but $\Delta lacZ::cat$	Laboratory stock
JW148	$\Delta fhuD::Kan$	NARA Institut ^a
P4X Hfr	Hfr	Delmas and Matic (2005)
Ele1	P4X Hfr $fhuD::Kan$	P1 (JW0148) \times P4X
XL1Blue MRF'	$recA1\ endA1\ gyrA96\ thi-1\ hsdR17supE44\ relA1\ lac^-$ [F' $proAB\ lacIqZ?M15\ Tn10$ (Tet ^R)]	Stratagen, USA
MG1655 Rif ^R F':Tn10	[F' $proAB\ lacIqZ?M15\ Tn10$ (Tet ^R)]	This work
ME12	MG1655lacZ Δ T-lacZ Δ P-yfp	Elez and Matic, submitted
ME12C	ME12 but $lacZ\Delta T$ is from <i>E. coli</i> CFT073	Elez and Matic, submitted
ME12C <i>recA</i>	ME12C but $recA938::Tn9-200$	Elez and Matic, submitted
ME12C <i>lexA1</i>	ME12C $lexA1malB::Tn9$	Elez and Matic, submitted
ME12C <i>mutS</i>	ME12C but $mutS::cat$	Elez and Matic, submitted
ME12C <i>recB</i>	ME12C $recB::phleo$	Elez and Matic, submitted
ME12C <i>recF</i>	ME12C $recF::Tn5$	Elez and Matic, submitted
ME12C <i>recB recF</i>	ME12C $recB::phleo\ recF::Tn5$	Elez and Matic, submitted
<i>Shigella flexneri</i>		
<i>S. flexneri</i> MM1	Clinical isolate	M. Morosini
<i>S. flexneri</i> MM1 Nal ^R	Spontaneous Nal ^R mutant	This work
Plasmids		
pSC101-Pless::GFP	Kan ^R	Ronen <i>et al.</i> (2002)
pSC101- <i>recA</i> ::GFP	Kan ^R	Ronen <i>et al.</i> (2002)

a. Obtained from Genobase: <http://ecoli.naist.jp>

be traversed with respect to random mutation. In fact, variants created by recombination have a significantly higher probability of retaining their function than those generated by random mutation (Drummond *et al.*, 2005 and references therein). Fluoroquinolones may also accelerate genetic exchange in treated bacteria and furthermore raise the probability of developing new antibiotic resistance by increasing recombination. For instance, extended-spectrum β -lactamases are the result of combining a reduced number of mutations (Blázquez *et al.*, 1995; 2000). Bacteria producing multiple β -lactamases simultaneously are frequently isolated (Szabo *et al.*, 2005). Thus, fluoroquinolones may accelerate the evolution of new extended-spectrum variants by stimulating the recombination between single-mutants instead of accumulating successive mutations (Cramer *et al.*, 1998).

Nonetheless, despite the above considerations, the dangerous effect of fluoroquinolones on the evolution and spread of antibiotic resistance is still an open question and requires carefully conducted *in vivo* studies to be clearly established.

Experimental procedures

Bacterial strains, plasmids and media

Strains, plasmids and their origins are described in Table 2. MG1655 Rif^R F':Tn10 [F' $proAB\ lacIqZ\Delta M15\ Tn10$ (Tet^R)] was constructed by conjugation with strain XL1Blue MRF' (Stratagene) selecting for transfer of the F':Tn10 episome

with rifampicin and tetracycline. ME12 and ME12C *recA*, *lexA1*, *recB*, *recF*, *recBrecF* and *mutS* derivatives were constructed by P1 transduction from strains harbouring the desired mutations (M. Elez and I. Matic, manuscript submitted). Both *recA*- and *lexA1* phenotypes were verified by measuring UV sensitivity. LB and minimal M9 with lactose as the sole carbon source were prepared according to Miller (Miller, 1972). MICs of CIP for ME12, ME12C and their mutant derivatives, were determined according to NCCLS recommendations (NCCLS, 1999), except that the bacterial inocula were identical to those used in all subsequent recombination, conjugation and mutagenesis experiments. The antibiotics and concentrations used were: nalidixic acid, Nal (40 μ g ml⁻¹), kanamycin, Kan (50 μ g ml⁻¹), tetracycline, Tet (20 μ g ml⁻¹), rifampicin, Rif (100 μ g ml⁻¹), and chloramphenicol, Cm (20 μ g ml⁻¹). CIP was used at different concentrations (see text). 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (Xgal) and Isopropyl-B-D-Thiogalactopyranoside (IPTG) were used at concentrations of 40 μ g ml⁻¹ and 1 mM respectively.

Live/dead and DAPI staining

Samples were stained with Live/dead[®] BacLight bacterial viability kit L-7012 following the supplier's instructions (Molecular Probes) which contains two fluorescent nucleic acid stains of different colours. The SYTO 9, green fluorescent, labels nucleic acids in all cells in a culture, and the red fluorescent nucleic acid stain propidium iodide only penetrates cells with damaged membranes. When both dyes are used, undamaged/living cells will stain green and damaged/dead cells will stain red (the SYTO 9 levels are reduced in

these cells) under the fluorescence microscope. Similarly, cells were stained with DAPI, as described elsewhere.

Measurement of the *recA* transcription

CIP-mediated induction of transcription from the *recA* promoter was measured by using the plasmids pSC101-*PrecA::GFP* and pSC101-*Pless::GFP*, a promoterless GFP vector (Ronen *et al.*, 2002). Strain MG1655 Nal^R containing either pSC101-*PrecA::GFP* or pSC101-*Pless::GFP* reporter plasmids was incubated overnight. Cultures were diluted to an OD₆₀₀ of 0.1 in fresh LB-kanamycin medium on a flat-bottom 96-well plate and incubated for 4 h at 37°C with shaking. Absorbance at 595-nm and fluorescence (filters 485 nm, 535 nm) was measured at 37°C on an Infinite M200 multiwell fluorimeter (Tecan, Switzerland). Background fluorescence of cells bearing a promoterless GFP vector was subtracted from the data of cells harbouring plasmid pSC101-*PrecA::GFP*. This avoided the possible undesirable effects of SOS induction such as an increase in plasmid copy number.

Construction of chromosomal *LacZ* diploid strains

Chromosomal *LacZ* diploid strains were constructed as described (M. Elez and I. Matic, manuscript submitted). Briefly, two non-functional *lacZ* alleles were cloned in close proximity (569 bp) in the *E. coli* chromosome. The first *lacZ* gene contains a C-terminal deletion (*lacZ'* ΔC), whereas the second one contains an N-terminal deletion (*lacZ* ΔN). The two alleles share an overlapping DNA region of 1.3 kb which is 100% (ME12) or 96% (ME12C) identical at the sequence level. The functional *lacZ* gene can be reconstituted by a single recombination event between the two gene fragments cited (Fig. 1A). Because *yfp* insertion in the lactose operon interfered with the *lacY* gene expression, a *Plac* promoter (*Plac*-2) was introduced in the *yfp/lacY* intervening region in both ME12 and ME12C strains (M. Elez and I. Matic, manuscript submitted). The expression of the YFP was very low, probably due to the presence of the long DNA region between the promoter *Plac*-1 and the structural *yfp* gene. When the *LacZ* gene is reconstructed by recombination, the *yfp* expression is increased. Recombinant individual cells can be visualized as bright cells under fluorescence microscopy (Fig. 1B). The time-course of the recombination induction can be followed by measuring the fluorescence of treated cultures.

Recombination experiments

Overnight cultures were diluted to an OD₆₀₀ of 0.1 in fresh LB medium and grown for 1 h at 37°C without shaking. For fluorescence measurements, 150 µl of culture were inoculated in the wells of a 96-microwell plate containing different concentrations of CIP and covered with 50 µl of mineral oil. Plates were incubated at 37°C with agitation and fluorescence (excitation 500 nm and emission 530 nm), and optical density (595 nm) was measured after 4 h of incubation (Infinite M200 fluorimeter).

For the Lac⁺ recombinants measurement, 2 ml of recipient cells were treated with increasing concentrations of CIP and incubated for 4 h at 37°C with shaking (250 r.p.m.). One

millilitre of these cultures was centrifuged 10 min at 6000 r.p.m. and the pellet was resuspended in 2 ml of fresh LB medium and incubated overnight at 37°C with shaking. This step is necessary to resolve the filaments formed after CIP treatment. Scavenger cells were grown to saturation in LB medium with the appropriate antibiotic. The resulting culture was diluted and a new culture started in fresh LB medium. When this culture reached saturation, about 10⁸ scavenger cells were washed three times with 10 mM MgSO₄ (to clear any contaminating sources of sugar) and were inoculated in 4 ml of soft M9 minimal medium agar containing Xgal and IPTG. Cells were spread on M9 minimal medium agar plates containing Xgal, IPTG and lactose as the sole carbon source. After 1 h at room temperature, appropriate dilutions of the antibiotic-treated cultures, washed with 10 mM MgSO₄, were inoculated in 4 ml of soft M9 minimal medium agar containing Xgal and IPTG and spread over the scavenger cells. Plates were incubated 48 h at 37°C. Recombination events were measured as the production of Lac⁺ colonies. The frequency of recombination was calculated as the number of Lac⁺ colonies per viable cell.

Conjugation experiments

Experiments with CIP were conducted by diluting overnight cultures of donor and recipient cells to an OD₆₀₀ of 0.1 in fresh LB medium and grown for 1 h at 37°C without shaking. Recipient cells were treated with increasing concentrations of CIP and incubated for 4 h at 37°C with shaking (250 r.p.m.). Cells were washed with 10 mM MgSO₄ to eliminate the antibiotic and resuspended in fresh LB. At this stage, appropriate dilutions were plated to perform a viable count. 5 × 10⁷–1 × 10⁸ donor cells (as deduced from previous experiments) were mixed 1:1 with cells of the CIP-treated recipient strain in a tube and incubated for 1 h at 37°C without shaking. The conjugation process was finished with vortexing. After incubation in ice for 10 min, the exconjugants were plated on rich medium agar with Nal and Kan for Hfr crosses and with Nal and Tet for F⁺:Tn10 crosses and were incubated overnight at 37°C. For the interspecies (*E. coli* × *S. flexneri* MM1) experiments the process was identical, except that the number of mating cells was increased 10-fold. Conjugation and conjugational recombination frequencies were calculated by dividing the number of exconjugants/recombinants by that of the donors.

Acknowledgements

We thank U. Alon for kindly providing the plasmids pSC101-*PrecA::GFP* and pSC101-*Pless::GFP*, M. Morosini for *S. flexneri* MM1, Nara Institut for strain JW148, J. Poyatos, J.M. Gómez-Gómez and J.C. Alonso for useful discussions and Elizabeth Osobliwa for proofreading the manuscript. We are grateful to two anonymous referees for their constructive comments. This work was supported by Grant BFU2004-00879 from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia and by Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008) and by Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III, Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REIPI RD06/0008).

References

- Andremont, A. (2003) Commensal flora may play key role in spreading antibiotic resistance. *ASM News* **69**: 601–606.
- Baquero, F., Negri, M.C., Morosini, M.I., and Blázquez, J. (1998) Antibiotic-selective environments. *Clin Infect Dis* **27**: S5–S11.
- Beaber, J.W., Hochhut, B., and Waldor, M.K. (2004) SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* **427**: 72–74.
- Bjorkholm, B., Sjolund, M., Falk, P.G., Berg, O.G., Engstrand, L., and Andersson, D.I. (2001) Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 14607–14612.
- Blázquez, J. (2003) Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. *Clin Infect Dis* **37**: 1201–1209.
- Blázquez, J., Morosini, M.I., Negri, M.C., González-Leiza, M., and Baquero, F. (1995) Single aminoacid replacements in position altered in naturally occurring extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 145–149.
- Blázquez, J., Morosini, M.I., Negri, M.C., and Baquero, F. (2000) Selection of naturally occurring extended-spectrum TEM beta-lactamase variants by fluctuating beta-lactam pressure. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 2182–2184.
- Blázquez, J., Gómez-Gómez, J.M., Oliver, A., Juan, C., Kapur, V., and Martín, S. (2006) PBP3 inhibition elicits adaptive responses in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **62**: 84–99.
- Camas, F.M., Blázquez, J., and Poyatos, J.F. (2006) Auto-genous and non-autogenous control of response in a genetic network. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 12718–12723.
- Caporale, L.H. (2003) Natural selection and the emergence of a mutation phenotype: an update of the evolutionary synthesis considering mechanisms that affect genome variation. *Annu Rev Microbiol* **57**: 467–485.
- Cirz, R.T., and Romesberg, F.E. (2006) Induction and inhibition of ciprofloxacin resistance-conferring mutations in hypermutator bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 220–225.
- Cirz, R.T., Chin, J.K., Andes, D.R., de Crécy-Lagard, V., Craig, W.A., and Romesberg, F.E. (2005) Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biol* **3**: e176.
- Courcelle, J., and Hanawalt, P.C. (2003) RecA-dependent recovery of arrested DNA replication forks. *Annu Rev Genet* **37**: 611–646.
- Cramer, A., Raillard, S.A., Bermudez, E., and Stemmer, W.P. (1998) DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. *Nature* **391**: 288–291.
- De la Cruz, F., and Davies, J. (2000) Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol* **8**: 128–133.
- Delmas, S., and Matic, I. (2005) Cellular response to horizontally transferred DNA in *Escherichia coli* is tuned by DNA repair systems. *DNA Repair* **4**: 221–229.
- Denamur, E., Tenaillon, O., Deschamps, C., Skurnik, D., Ronco, E., Gaillard, J.L., et al. (2005) Intermediate mutation frequencies favor evolution of multidrug resistance in *Escherichia coli*. *Genetics* **171**: 825–827.
- Dimpfl, J., and Echols, H. (1989) Duplication mutation as an SOS response in *Escherichia coli*: enhanced duplication formation by a constitutively activated RecA. *Genetics* **123**: 255–260.
- Drlica, K., and Hooper, D.C. (2003) Mechanisms of quinolone action. In *Quinolone Antimicrobial Agents*, 3rd edn. Hooper, D.C. and Rubinstein, E. (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 19–40.
- Drummond, D.A., Silberg, J.J., Meyer, M.M., Wilke, C.O., and Arnold, F.H. (2005) On the conservative nature of intragenic recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 5380–5385.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A., and Ellenberger, T. (2005) *DNA Repair and Mutagenesis*, 2nd edn. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Groisman, E.A., and Ochman, H. (1996) Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* **87**: 791–794.
- Guttman, D.S., and Dykhuizen, D.E. (1994) Clonal divergence in *Escherichia coli* as a result of recombination, not mutation. *Science* **266**: 1380–1383.
- Katz, L.A. (1999) The tangled web: gene genealogies and the origin of eukaryotes. *Am Nat* **154**: S137–S145.
- Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggleston, A.K., Lauder, S.D., and Rehauer, W.M. (1994) Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **58**: 401–465.
- Kreuzer, K.N. (2005) Interplay between DNA replication and recombination in prokaryotes. *Annu Rev Microbiol* **59**: 43–67.
- Lanzov, V.A., Bkhlanova, I.V., and Clark, A.J. (2005) Conjugational hyperrecombination achieved by derepressing the LexA regulon, altering the properties of RecA protein and inactivating mismatch repair in *Escherichia coli* K-12. *Genetics* **163**: 1243–1254.
- Lawrence, J.G., and Ochman, H. (1998) Molecular archeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 9413–9417.
- Lawrence, J.G., and Roth, J.R. (1996) Horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics* **143**: 1843–1860.
- Leclerc, J.E., Li, B., Payne, W.L., and Cebula, T.A. (1996) High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science* **274**: 1208–1211.
- Lederberg, J., and Lederberg, E.M. (1952) Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J Bacteriol* **63**: 399–406.
- Little, J.W., Edmiston, S.H., Pacelli, Z., and Mount, D.W. (1980) Cleavage of the *Escherichia coli* LexA protein by the RecA protease. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 3225–3229.
- Luo, Y., Pfuetzner, R.A., Mosimann, S., Paetzel, M., Frey, E.A., Cherney, M., et al. (2001) Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage. *Cell* **106**: 585–594.
- Luria, S.E., and Delbrück, M. (1943) Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* **28**: 491–511.
- Lusetti, S.L., and Cox, M.M. (2002) The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. *Annu Rev Biochem* **71**: 71–100.

- Mao, E.F., Lane, L., Lee, J., and Miller, J.H. (1997) Proliferation of mutators in a cell population. *J Bacteriol* **179**: 417–422.
- Matic, I., Rayssiguier, C., and Radman, M. (1995) Interspecies gene exchange in bacteria: the role of SOS and mismatch repair systems in evolution of species. *Cell* **80**: 507–515.
- Matic, I., Radman, M., Taddei, F., Piccard, B., Doit, C., Bingen, E., *et al.* (1997) Highly variable mutation rates in commensal and pathogenic *E. coli*. *Science* **277**: 1833–1834.
- Matic, I., Taddei, F., and Radman, M. (2000) No genetic barriers between *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*. SOS-induced mismatch repair-deficient cells. *J Bacteriol* **182**: 5922–5924.
- Maxwell, A., and Critchlow, S.E. (1998) Mode of action. In *Quinolone Antibacterials*. Kuhlmann, J., Dalhoff, A., and Zeiler, H.-J. (eds). Berlin: Springer-Verlag, pp. 119–166.
- Michel, B., Grompone, G., Flores, M.J., and Bidnenko, V. (2004) Multiple pathways process stalled replication forks. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 12783–12788.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics* pp. 352–355. Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (1999) *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. Approved Standard M21-A*. Wayne, PA: NCCLS.
- Newcombe, H. (1949) Origin of bacterial variants. *Nature* **164**: 150–151.
- Newmark, K.G., O'Reilly, E.K., Pohlhaus, J.R., and Kreuzer, K.N. (2005) Genetic analysis of the requirements for SOS induction by nalidixic acid in *Escherichia coli*. *Gene* **356**: 69–76.
- Ochman, H., Lawrence, J.G., and Groisman, E.A. (2000) Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299–304.
- Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F., and Blázquez, J. (2000) High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* **288**: 1251–1253.
- Oliver, A., Baquero, F., and Blázquez, J. (2002) The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol Microbiol* **43**: 1641–1650.
- Pérez-Capilla, T., Baquero, M.R., Gómez-Gómez, J.M., Ionel, A., Martín, S., and Blázquez, J. (2005) SOS-Independent Induction of *dinB* Transcription by beta-lactam-mediated Inhibition of Cell wall synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 1515–1518.
- Petit, M.A., Dimpfl, J., Radman, M., and Echols, H. (1991) Control of chromosomal rearrangements in *E. coli* by the mismatch repair system. *Genetics* **129**: 327–332.
- Power, E.G., and Phillips, I. (1993) Correlation between *umuC* induction and *Salmonella* mutagenicity assay for quinolone antimicrobial agents. *FEMS Microbiol Lett* **112**: 251–254.
- Prudhomme, L.A., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., and Claverys, J.P. (2006) Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **313**: 89–92.
- Rayssiguier, C., Thaler, D.S., and Radman, M. (1989) The barrier to recombination between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is disrupted in mismatch-repair mutants. *Nature* **342**: 396–401.
- Richardson, A.R., and Stojiljkovic, I. (2001) Mismatch repair and the regulation of phase variation in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **40**: 645–655.
- Ronen, M., Rosenberg, R., Shraiman, B.I., and Alon, U. (2002) Assigning numbers to the arrows: parameterizing a gene regulation network by using accurate expression kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 10555–10560.
- Rosenberg, S.M. (2001) Evolving responsively: adaptive mutation. *Nat Rev Genet* **2**: 504–515.
- Spratt, B.G., Hanage, W.P., and Feil, E.J. (2001) The relative contributions of recombination and point mutation to the diversification of bacterial clones. *Curr Opin Microbiol* **4**: 602–606.
- Szabo, D., Melan, M.A., Hujer, A.M., Bonomo, R.A., Hujer, K.M., Bethel, C.R., *et al.* (2005) Molecular analysis of the simultaneous production of two SHV-type extended-spectrum beta-lactamases in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* by using single-nucleotide polymorphism genotyping. *Antimicrob Agents Chemother* **49**: 4716–4720.
- Ubeda, C., Maiques, E., Knecht, E., Lasa, I., Novick, R.P., and Penades, J.R. (2005) Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in staphylococci. *Mol Microbiol* **56**: 836–844.
- Vulic, M., Dionisio, F., Taddei, F., and Radman, M. (1997) Molecular keys to speciation: DNA polymorphism and the control of genetic exchange in enterobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 9763–9767.
- Watson, M.E., Burns, J.L., and Smith, A.L. (2004) Hypermutable *Haemophilus influenzae* with mutations in *mutS* are found in cystic fibrosis sputum. *Microbiology* **150**: 2947–2958.
- Willmott, C.J.R., Critchlow, S.E., Eperon, I.C., and Maxwell, A. (1994) The complex of DNA gyrase and quinolone drugs with DNA forms a barrier to transcription by RNA polymerase. *J Mol Biol* **242**: 351–363.
- Woese, C.R. (2000) Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 8392–8396.
- Ysern, P., Clerch, B., Castaño, M., Gilbert, I., Barbé, J., and Llagostera, M. (1990) Induction of SOS genes in *Escherichia coli* and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by fluoroquinolones. *Mutagenesis* **5**: 63–66.
- Zhan, G.G., Ennis, K., Vercaigne, L., Walkty, A., Gin, A.S., Embil, J., *et al.* (2002) A critical review of the fluoroquinolones: focus on respiratory infections. *Drugs* **62**: 13–59.